

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

DÉTERMINATION DU TITRE ANTITOXIQUE  
DES SÉRUMS ANTI-*PERFRINGENS* A,  
ANTI-VIBRION SEPTIQUE, ANTI-HISTOLYTIQUE  
ET ANTI-ŒDEMATIENS

PRÉPARATION, TITRAGE ET PROPRIÉTÉS  
DES TOXINES CORRESPONDANTES

(QUATRIÈME MÉMOIRE)

ÉTUDES SUR LA TOXINE DU *BACILLUS HISTOLYTICUS*\*

par MAYLIS GUILLAUMIE.

(*Institut Pasteur.*)

Au début d'une série de recherches sur le titrage des sérums antigangréneux nous avons constaté que la variabilité de constitution de la toxine *perfringens* rend extrêmement complexe le problème de l'évaluation du titre antitoxique des immunsérums correspondants. En utilisant comparativement différentes préparations de cette toxine pour titrer un même sérum anti-*perfringens* nous avons, en effet, maintes fois enregistré des résultats discordants : nous avons signalé des écarts

\* Synonyme : *Clostridium histolyticum*.

de 5 à 80 p. 100 et même des divergences plus considérables encore entre les valeurs antitoxiques attribuées à ce sérum au cours des divers dosages. Toutes les déterminations ont cependant été réalisées avec des échantillons de toxine élaborée par la même souche de *B. perfringens* type A\*\* ; après discussion des résultats nous avons pensé que ces échantillons doivent contenir à des taux très inégaux les divers antigènes caractéristiques de l'exotoxine du *B. perfringens* A (1).

Nous avons désigné par E 1, E 2, E 3, E 4, etc. les échantillons successifs de toxine *perfringens* que nous avons préparés par le même procédé. Avec beaucoup d'entre eux, nous avons titré de nombreux sérums anti-*perfringens* ; voici quelques-uns des résultats que nous avons notés :

Le sérum 103 (saignée du 20 mars 1936) contient 275 unités d'après les titrages effectués avec une « dose-test française » des échantillons E 1 ou E 4 ; 350 unités lorsque le titrage est pratiqué avec les échantillons E 11, E 13 ; 450 à 500 unités vis-à-vis de la toxine E 14 (2). Le sérum 135 titre 575, 550, 350 à 400, 200 ou 75 unités internationales suivant que les dosages sont faits avec les échantillons E 13, E 15, E 22, E 18 ou E 25. Le sérum 376 titre 225 à 250, 325, 200 ou 50 à 75 unités

\*\* Synonymes : *Clostridium welchii* ; *Welchia perfringens*.

(1) WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (Maylis). *Revue d'Immunol.*, 2, 1936, p. 513 ; C. R. *Soc. de Biol.*, 123, 14 novembre 1936, p. 661 ; *ibid.*, 126, 1937, p. 656 ; C. R. *Acad. des Sciences*, 204, 1937, p. 1012 ; *Bull. trimest. de l'Organ. d'Hyg. de la Soc. des Nations*, 7, 1938, p. 883 ; *Revue d'Immunol.*, 5, 1939, p. 5. — GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 66, 1941, p. 204.

Les résultats tout à fait concordants des titrages effectués par Prigge, avec 2 toxines peu hémolytiques préparées en Allemagne, ont différé de ceux obtenus simultanément avec une toxine plus hémolytique provenant d'Angleterre ; 4 sérums inégalement antitoxiques ont été titrés par l'auteur avec ces différentes toxines. Les chiffres qu'il indique montrent que, suivant le sérum examiné, le titre trouvé avec l'une ou l'autre des toxines allemandes diffère de 5, 18 ou 21 p. 100 de celui qui est précisé avec la toxine anglaise. (*Zeitsch. f. Imm. and exper. Ther.*, 89, 31 décembre 1936, p. 477.)

H. W. Glotova n'a pas observé de résultats divergents en titrant les sérums anti-*perfringens* (*Ces Annales*, 59, 1937, p. 526), mais Ipsen, après avoir relevé, en 1939, avec Llewellyn-Smith et Sordelli, des différences de 78 p. 100 au cours du titrage de 3 sérums anti-*perfringens* avec 3 échantillons de toxine, a ultérieurement enregistré des discordances plus accentuées en utilisant d'autres échantillons de toxine *perfringens* (*Bull. organ. Hyg. Soc. des Nations*, 8, 1939, p. 899.)

(2) *Revue d'Immunol.*, 5, 1939, p. 23 ; dans ce tableau, rectifier le dernier résultat de la troisième colonne : lire 550 au lieu de 350 (titre antitoxique du sérum 103, vis-à-vis d'une « dose-test anglaise » de la toxine E 14).



internationales d'après les titrages réalisés respectivement avec les toxines E 8, E 9, E 10 ou E 11 (titrages sur souris de 17, à 20 grammes, injections intraveineuses).

Par contre, en titrant 4 sérums anti-vibron septique avec une « dose-test » de 7 échantillons de toxine homologue, nous avons souvent obtenu pour un même sérum des titres *égaux* ou *voisins*. Les résultats discordants que nous avons notés ont différé parfois de 15 à 25 p. 100 mais de 10 p. 100 au maximum dans la majorité des cas (3).

Nous avons également examiné la question du titrage des sérums anti-histolytique ; dans ce mémoire nous rapportons les résultats de ces recherches ainsi que le titre de la toxine histolytique préparée dans divers bouillons ; nous étudions aussi les propriétés hémolytiques et antigènes de cette toxine et indiquons en outre les valeurs de la « dose-test » de différents échantillons titrés comparativement avec deux sérums étalons.

#### PRÉPARATION ET TITRAGE DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE

Du bouillon Vf (4), préparé avec des muscles et du foie de bœuf ou de cheval, est ajusté à pH 7,6, chauffé à 100°, filtré, puis réparti dans des flacons de 5 litres en verre pyrex et dans de grands tubes de 150 cent. cubes. Les flacons et les tubes sont stérilisés à la température de 110° pendant vingt-cinq à trente minutes (5). Après stérilisation, les tubes sont ensemencés et mis dans une étuve à 37°. Le lendemain, les flacons sont portés à la température de 100° pendant vingt-cinq minutes, puis rapidement amenés à la température de 37° dans un bain-marie ; chaque flacon contenant 4 litres de bouillon est ensemencé avec 30 cent. cubes environ de la culture de *B. histolytique* effectuée dans les tubes de 150 cent. cubes. Après avoir maintenu les flacons ensemencés pendant vingt à vingt-deux heures à 37° nous centrifugeons les cultures et nous déterminons la toxicité du liquide de centrifugation en appliquant le protocole que nous avons suivi (6) pour titrer une toxine vibron septique : la toxine convenablement diluée

(3) GUILLAUMIE (Maylis). Ces *Annales*, 67, 1941, p. 112-153.

(4) Nous avons donné le mode de préparation de ce bouillon dans un travail antérieur. Ces *Annales*, 66, 1941, p. 373.

(5) Le pH du bouillon après stérilisation varie entre 7,5 et 7,6. Celui des cultures centrifugées vingt-deux heures après l'ensemencement oscille entre 7,1 et 7,6.

(6) Ces *Annales*, 67, 1941, p. 120.

est injectée par voie veineuse à des souris de 17 à 20 grammes ; les dilutions sont effectuées avec de l'eau physiologique et le volume injecté à chaque souris est de 0 c. c. 5 ; les animaux sont observés pendant trois jours.

### A. — Toxine liquide.

#### 1° TITRE DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE PRÉPARÉE DANS DU BOUILLON VF DE BŒUF.

a) BOUILLON VF ORDINAIRE. — Au cours de toutes nos recherches les bouillons ont étéensemencés avec la même souche de B. histolytique : la souche Letivi ; mais tandis que dans nos premiers essais elle était soumise à deux passages sur cobayes avant de l'utiliser pour préparer un nouvel échantillon de toxine histolytique, depuis plus de deux ans (avril 1939) elle n'a subi aucun passage *in vivo* : conservée à 2°, en tubes scellés sous le vide, dans du bouillon Vf contenant un petit cube d'ovalbumine, elle ne perd pas ses propriétés toxigènes ; elle nous permet en effet d'obtenir, à partir des bouillons Vf de bœuf additionnés ou non de 5 grammes par litre de glucose, des toxines dont le titre est au moins égal, sinon supérieur, à celui des toxines que nous préparions avant, avec la souche qui venait de subir 2 passages sur cobayes.

Le titre des 37 préparations que nous avons effectuées de mai 1939 à juin 1940 a été le suivant : 2 ont contenu, par centimètre cube, 75 à 100 doses mortelles (D.M.) ; 18 : 100 ou 150 à 200 D.M. ; 16 : 200 ou 200 à 300 D.M. et 1 préparation 300 D.M. par centimètre cube.

Alors que d'après les expériences de Stewart (7), il apparaît plus de toxine histolytique dans les bouillons glucosés à 2 p. 100 que dans les bouillons sans glucose, d'après Walbum et Reymann (8) l'addition de glucose est plutôt défavorable à

(7) STEWART (S. E.). *J. of Bact.*, **31**, 1936, p. 70-71.

D'après M. Weinberg et A. Randin (*C. R. Soc. Biol.*, **110**, 1932, p. 352), il apparaît plus de ferment fibrolytique dans les cultures de bacille histolytique effectuées dans des bouillons glucosés à 2 p. 100 que dans les bouillons moins glucosés.

(8) WALBUM (L. E.) et REYMANN (G. C.). *J. of Path. a. Bact.*, **46**, 1938, p. 315-322.



la production de la toxine. Dans nos expériences nous avons obtenu sensiblement les mêmes quantités de toxine dans les bouillons Vf non glucosés que dans les mêmes bouillons additionnés de 5 p. 1.000 de glucose.

b) BOUILLON VF ADDITIONNÉ D'UN MÉLANGE-TAMPON. — Nous avons signalé antérieurement que le bouillon Vf additionné, par litre, de 5 ou 8 grammes de phosphate bipotassique et de 2 grammes de pyruvate de sodium est souvent plus favorable à la formation de la toxine *perfringens* (9) et de la toxine vibron septique (10) que le bouillon Vf ordinaire. Dans le but d'améliorer aussi la production de la toxine histolytique dans le bouillon Vf de bœuf, nous avons ajouté à ce bouillon, aussitôt après l'avoir stérilisé et juste avant l'ensemencement, soit une solution stérile de phosphate bipotassique, soit un mélange fraîchement préparé de phosphate bipotassique et de pyruvate de soude. Pour réaliser ces essais nous avons procédé exactement comme dans les expériences similaires sur la préparation des toxines *perfringens* et vibron septique. Nous avons constaté que dans 5 cas sur 9 le mélange-tampon a renforcé la toxinogénèse dans les bouillons Vf employés.

Dans le tableau I nous comparons, vingt-deux heures après l'ensemencement, la toxicité et le pH de quelques cultures effectuées dans du bouillon Vf additionné ou non de phosphate de potassium et de pyruvate de sodium. Les déterminations ont été réalisées après centrifugation des cultures. Dans l'essai du 27 mars, le titre de la toxine préparée dans le bouillon ordinaire a été de 100 D.M. par centimètre cube ; celui de la toxine obtenue dans le bouillon additionné de 5 grammes par litre de phosphate bipotassique a été de 150 D.M. par centimètre cube ; celui de la toxine élaborée dans le bouillon contenant le mélange-tampon : phosphate + pyruvate a été de 200 à 300 D.M. par centimètre cube.

Le 4 avril, les toxines préparées dans le bouillon Vf ordinaire et dans le bouillon Vf + phosphate + pyruvate titraient respectivement 200 et 300 D.M. par centimètre cube.

(9) GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 66, 1941, p. 359.

(10) GUILLAUMIE (Maylis). *Ces Annales*, 67, 1941, p. 128.

TABLEAU I. — Titre de la toxine histolytique préparée dans du bouillon Vf additionné ou non d'un mélange-tampon.

DATE de l'expérience	VOLUME ensemencé	BOUILLON Vf ordinaire		BOUILLON Vf tamponné	
		pH après culture	D. M. M. par centimètre cube	pH après culture	D. M. M. par centimètre cube
27 mars 1939 . . . .	40 c. c.	7,3	400	7,4	200-300
4 avril 1939 . . . .	4 lit.	7,65	200	7,5	300-350
4 juillet 1939 . . . .	4 lit.	7,1	150	6,8	200
4 juillet 1939 . . . .	4 lit.	7	250	6,9	250
11 septembre 1939 . .	4 lit.	7,1	75-100	7,05	250
20 septembre 1939 . .	4 lit.	7,4	150	7,3	150
20 septembre 1939 . .	4 lit.	7,3	150-200	7,25	150-200
10 octobre 1939 . . .	4 lit.	7,3	200	7,2	275
19 octobre 1939 . . .	4 lit.		200		
4 janvier 1940 . . . .	4 lit.	7,5	200-300		
1 <sup>er</sup> avril 1940 . . . .	4 lit.		200-250		
8 mai 1940 . . . . .	4 lit.		200		
4 juin 1940 . . . . .	4 lit.		200		

c) BOUILLON VF ADDITIONNÉ DE SANG DESSÉCHÉ. — Encouragée par les résultats que nous avons notés au cours de nos expériences sur la préparation de la toxine *perfringens* dans les bouillons Vf auxquels nous avons ajouté 1 ou 1,5 p. 1.000 de sang desséché (11), nous avons recherché si la toxine histolytique apparaissait dans de tels bouillons en plus grande quantité que dans le bouillon Vf ordinaire. Plusieurs essais nous ont montré que l'élaboration de la toxine histolytique n'est nullement influencée par le sang desséché. Ainsi, cette substance, favorable à la production de la toxine *perfringens*, est sans effet sur la genèse de la toxine histolytique dans le bouillon Vf de bœuf ; nous avons signalé antérieurement qu'elle ne renforçait généralement pas la formation de la toxine vibron septique dans ce bouillon (12).

(11) GUILLAUMIE (Maylis). Ces *Annales*, 66, 1941, p. 331 et 67, 1941, p. 135.

(12) GUILLAUMIE (Maylis). Ces *Annales*, 67, 1941, p. 136.



2° TITRE DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE PRÉPARÉE  
DANS DIVERS BOUILLONS.

Nous avons comparé le titre des toxines histolytiques obtenues en l'absence de glucose dans les divers bouillons que nous avons examinés au cours de nos recherches sur l'obtention de la toxine vibrion septique (13) : digestion pepsique de foie de cheval, digestion pepsique de viande et de foie de cheval (bouillons Vf et Wf de cheval). Nous avons en outre préparé de la toxine histolytique dans une digestion pepsique de foie de cheval additionnée, en volume, de 5 p. 100 de digestion papaïnique de sang coagulé de cheval. Ces divers bouillons ont été ajustés à pH 7,55 avant de les stériliser. Les cultures, réalisées à 37°, ont été centrifugées après vingt-deux heures d'étuve ; la toxine centrifugée a été titrée sur souris de 17 à 20 grammes par voie veineuse.

a) DIGESTION PEPSIQUE DE FOIE. — La digestion pepsique de foie additionnée de digestion papaïnique de sang coagulé nous a permis d'obtenir de la toxine histolytique contenant 150 à 200 doses mortelles par centimètre cube.

b) DIGESTION PEPSIQUE DE VIANDE ET DE FOIE DE CHEVAL. — Nous avonsensemencé 12 bouillons Vf de cheval préparés à des dates différentes (14). Les toxines que nous avons obtenues à partir de ces bouillons ont contenu, par centimètre cube : 75 D.M. (une fois), 100 ou 150 à 200 D.M. (4 fois), 200, 250 ou 300 D.M. (7 fois). Leur pH a varié entre 7,2 et 7,6.

A la concentration de 4,5 p. 1.000 la peptone Defresne a peu influencé la production de la toxine histolytique dans des bouillons qui permettaient de préparer des toxines contenant 150 à 250 doses mortelles par centimètre cube. La peptone

(13) *Idem.*, p. 136 à 141.

(14) WEIL (L.), KOCHOLATY (W.) et SMITH (L. D.), au cours de leurs recherches sur les protéases de divers anaérobies, ont utilisé des bouillons de viande de cheval pour préparer l'exoprotéase du *B. perfringens* et du *B. histolyticus* ; ils ont longuement étudié les propriétés protéolytiques des cultures filtrées, mais n'ont pas recherché leur toxicité. *Biochem. J.*, 33, 1939, p. 893.

Witte, à la concentration de 10 p. 1.000, n'a pas accru la valeur nutritive du bouillon Vf de cheval dans 3 essais sur 4. Dans ces 3 cas le titre des toxines en l'absence de peptone a été de 150 à 200, 200 et 250 D.M. par centimètre cube. Dans le cas où la peptone Witte a accentué la toxinogénèse, le titre de la toxine obtenue dans le bouillon Vf était seulement de 50 D.M. par centimètre cube et celui de la toxine préparée en présence de peptone 150 D.M. Au cours de cette même expérience, le titre de la toxine élaborée dans le bouillon additionné de 10 p. 1.000 de peptone Defresne a été de 75 à 100 D.M. par centimètre cube.

La quantité de toxine histolytique formée dans le bouillon Vf a été plus grande que dans les bouillons Wf préparés avec deux fois plus de viande de cheval que les bouillons Vf (15).

#### B. — Toxine histolytique précipitée par le sulfate d'ammonium.

Au cours de nos recherches nous avons non seulement comparé le titre des toxines liquides préparées dans divers bouillons, mais encore les quantités de toxine que le sulfate neutre d'ammonium pur permet de précipiter et la valeur de la dose minima mortelle des toxines précipitées, titrées (16) après dessiccation et pulvérisation.

Pour précipiter la toxine histolytique nous avons opéré comme dans nos expériences de préparation de la toxine *perfringens* précipitée (17). Nous la conservons à l'état sec, à 2°, en ampoules scellées sous le vide. Dans le tableau II nous indi-

(15) Par la méthode Sørensen, nous avons constaté que les bouillons Wf ont une teneur en azote aminé deux fois plus élevée que les bouillons Vf. Après vingt-deux heures d'étuve à 37°, les cultures de B. histolytique sont centrifugées, titrées, puis conservées à 2° ; il se forme à cette température, dans les toxines préparées à partir des bouillons Wf, un abondant précipité contenant de la tyrosine, de la créatinine, du phosphate ammoniaco-magnésien.

(16) Le titrage est effectué sur souris de 17 à 20 grammes. Le poids de toxine qui tue la moitié environ des souris injectées indique la valeur de la dose minima mortelle de la toxine.

(17) Ces *Annales*, 66, 1941, p. 228.



TABLEAU II. — Dose minima mortelle de 13 échantillons de toxine histolytique préparés dans des bouillons Vf non glucosés ou additionnés de 5 p. 1.000 de glucose. Poids sec de toxine obtenu par litre de bouillon ensemencé.

ÉCHANTILLONS DE TOXINE	GLUCOSE par litre de bouillon (grammes)	TOXINE PRÉCIPITÉE	
		Poids sec par litre de bouillon (grammes)	D. M. M. (milligramme)
H <sub>2</sub> 2 octobre 1935 . . . . .	0	6,125	0,035
H <sub>3</sub> 8 décembre 1937 . . . . .	0	0,375	0,02
H <sub>4</sub> 14 décembre 1937 . . . . .	0	0,920	0,025
H <sub>5</sub> 14 juin 1938 . . . . .	0	1,125	0,015
H <sub>8</sub> 13 mars 1939 . . . . .	0	1,625	0,045
H <sub>9</sub> 4 avril 1939 . . . . .	0	2,275	0,02
H <sub>10</sub> 20 septembre 1939 . . . . .	0	4,250	0,03
H <sub>14</sub> 14 janvier 1940 . . . . .	0	1,260	0,018
H <sub>3g</sub> 8 décembre 1937 . . . . .	5	0,360	0,015
H <sub>4g</sub> 14 décembre 1937 . . . . .	5	0,840	0,015
H <sub>6</sub> 13 octobre 1938 . . . . .	5	6,875	0,04
H <sub>7</sub> 18 novembre 1938 . . . . .	5	1,950	0,03
H <sub>13</sub> 16 novembre 1938 . . . . .	5	0,675	0,03

quons la date de préparation de quelques échantillons de toxine histolytique obtenus dans des bouillons Vf de bœuf, ainsi que le poids sec de la toxine précipitée par litre de bouillon glucosé ou non et la valeur de la dose minima mortelle de chacun de ces échantillons.

En faisant la moyenne des résultats que nous avons obtenus au cours des 9 expériences réalisées avec des bouillons non glucosés et au cours de 5 autres faites avec des bouillons glucosés à 5 p. 1.000, nous avons constaté que le poids moyen de toxine obtenu par litre de bouillon non glucosé est de 2 gr. 300 et qu'il est de 2 gr. 140 par litre de bouillon glucosé à 5 p. 1.000.

La valeur moyenne de la dose minima mortelle des 15 échantillons de toxine histolytique que nous avons préparés a été de 0 milligr. 03 (chiffres extrêmes : 0,015 et 0,045).

Le pourcentage de toxine précipitée par le sulfate d'ammonium a varié entre 36,8 et 90 p. 100. Dans les expériences des 2 octobre 1935, 14 décembre 1937, 4 avril 1939, 20 sep-

tembre 1939, 21 décembre 1939, le précipité a, en effet, respectivement contenu 90, 36,8, 56,5, 70 et 40 p. 100 de la toxine présente dans le liquide additionné de sulfate.

a) DOSE MINIMA HÉMOLYTIQUE DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE.

D'après Weinberg et Seguin (18), Hall et Peterson (19), le B. histolytique n'élabore pas d'hémotoxine. D'après Mita (20), par contre, la toxine histolytique liquide hémolyse les hématies d'homme, de cheval, de bœuf, de chien, de lapin et de cobaye. Celarek et Stetkiewicz (21) ont également observé l'effet hémolytique de cette toxine sur les globules de lapin.

D'après nos essais, la toxine histolytique a la propriété de lyser les hématies de mouton. En recherchant l'activité hémolytique d'une série de préparations contenant, d'après les titrages sur souris, 200 et 300 doses mortelles de toxine par centimètre cube, nous avons constaté qu'elles hémolysaient, à 38°, 0 c. c. 1 d'une suspension de globules à 5 p. 100 aux doses de 0,004 à 0 c. c. 002 (22). Signalons aussi que l'hémolysine de la toxine histolytique liquide est détruite à 100° : les échantillons de toxine précédemment titrés n'hémolysent plus aux doses de 0,01, 0,1, 0,5 et même 0 c. c. 8 après un séjour de quinze minutes dans un bain-marie bouillant.

(18) WEINBERG (M.) et SEGUIN (P.). *C. R. Soc. de Biol.*, **80**, 1917, p. 157.

(19) HALL et PETERSON. *Proceed. Soc. Exper. biol. a. Med.*, **20**, 1932, p. 502.

(20) MITA (Taizo). *Japan. Journ. of exper. Med.*, **12**, 1934, p. 285-297.

(21) CELAREK (J.) et STETKIEWICZ (S.) *C. R. Soc. de Biol.*, **122**, 1936, p. 143.

(22) Au cours de ces recherches, nous avons utilisé des toxines préparées dans du bouillon VI de cheval. Pour les titrer, c'est-à-dire pour déterminer la plus petite quantité de toxine qui hémolyse totalement les globules employés, nous les avons réparties par quantités décroissantes dans des séries de tubes ; dans chacun nous avons ensuite ajouté une quantité suffisante d'eau physiologique pour que le volume total, après addition des hématies, soit égal à 1 cent. cube ; puis tous les tubes sont portés à 38° pendant quatre heures et soigneusement examinés au bout de ce temps ; après notation des résultats, les tubes sont laissés à la température du laboratoire jusqu'au lendemain : une deuxième lecture est alors faite pour contrôler les résultats notés au cours de la première. Signalons en outre que tous les essais sont faits en double.



Nous avons évalué l'effet hémolytique de 9 échantillons desséchés de toxine histolytique précipitée (H1, H2, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10) conservés à 2° et en ampoules scellées sous le vide. Les 8 premiers, titrés en mai 1939 et le dernier au mois de septembre de la même année (23), ont hémolysé 0 c. c.1 de globules de mouton à 5 p. 100 respectivement aux doses de 0, 0,4, 0,04, 0,8 1,5, 0,06, 0,6, 0,07, 0,03 et 0 milligr. 25 (tableau III). Pour nous renseigner sur leur degré de stabilité à l'état sec nous avons recherché leur titre deux ans plus tard. Nous avons constaté que l'activité hémolytique de ces échantillons n'avait pas varié.

La propriété hémolytique de la toxine histolytique précipitée disparaît à 100° ; en effet, après cinq minutes de chauffage à cette température, les solutions à 1 milligramme par centimètre cube des toxines H1, H2, H6, H8, H9 n'ont plus d'action hémolytique aux doses de 0,1, 0,2, 0,4, 0 milligr. 8.

Au cours de recherches approfondies sur le pouvoir hémolytique de la toxine *perfringens*, nous avons constaté, avec M. Fabre et G. Charles, que la cystéine, ajoutée à 20 échantillons de toxine liquide qui s'étaient considérablement atténués au cours du vieillissement, ramenait au *taux initial* l'activité hémolytique de 17 d'entre eux (24) et rétablissait

(23) Pour effectuer ces déterminations, nous avons adopté le principe du titrage que nous avons indiqué dans les expériences analogues sur la toxine *perfringens* (ces *Annales*, 66, 1941, p. 336). Chaque échantillon est dissous dans de l'eau physiologique à raison de 1 milligramme par centimètre cube ; la solution est maintenue à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière ; le titrage est commencé une heure après avoir préparé la solution.

(24) En voici un exemple : la dose minima hémolytique (D.M.H.) d'un échantillon de toxine *perfringens* préparé le 20 novembre 1940 est de 0 c. c. 0004 le jour de la préparation (pH de cette toxine 6,8). La D.M.H., vingt jours plus tard, est de 0,02 (pH de la toxine atténuée, conservée à 2°, en tube stérile bouché au coton : 7,25). Cette toxine est alors additionnée à la température du laboratoire, de 1 p. 1.000 de chlorhydrate de cystéine, puis titrée trente minutes plus tard ; la D.M.H. de la solution devient égale à 0 c. c. 0004. Le nombre de doses hémolytiques, par centimètre cube, passe donc de 50 à 2.500 sous l'influence de la cystéine. Par des expériences témoins appropriées nous avons vérifié que l'effet réducteur de la cystéine est seul responsable du phénomène de l'activation de la toxine *perfringens* liquide atténuée. Nous avons établi ensuite que le glutathion réduit rétablit intégralement, et l'acide ascorbique en partie seulement, l'activité hémolytique de 5 échantillons atténués susceptibles d'être *totale*ment réactivés par la cystéine.

partiellement celle des 3 autres. Afin de préciser aussi les conditions optima de l'activité hémolytique de la toxine *perfringens* précipitée par le sulfate d'ammonium, nous avons ensuite évalué l'activité de plusieurs de nos échantillons de toxine dissous à la concentration de 1 p. 1.000 dans divers solvants : dans de l'eau physiologique, dans des solutions tamponnées de pH compris entre 6 et 8,4, dans des bouillons Vf de pH 7,3 et 7,4 et, enfin, dans les mêmes bouillons additionnés de 1 p. 1.000 de chlorhydrate de cystéine. Nous exposerons en détail, par ailleurs, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus. De ces recherches, nous ne rapporterons ici que les faits suivants :

1° En solution dans des mélanges de phosphates monopotassique et disodique, de pH 6 ou 6,5, 5 échantillons de toxine sur 6 sont plus hémolytiques qu'en solution dans des mélanges-tampons alcalins ou dans l'eau physiologique (25). La cystéine à la dose de 1 p. 1.000 n'augmente pas l'activité hémolytique des toxines dissoutes depuis trente à soixante minutes, soit dans les mélanges-tampons de pH 7,1 ou 7,2, soit dans l'eau physiologique.

2° En solution dans du bouillon Vf (26), un échantillon de toxine sur 10 est moins hémolytique qu'en solution dans l'eau physiologique, mais les 9 autres sont aussi hémolytiques, sinon plus, que dans l'eau physiologique.

3° La cystéine, ajoutée à 4 des échantillons ci-dessus de toxine *perfringens* dissous depuis trente à soixante minutes dans des bouillons Vf, augmente appréciablement l'activité hémolytique des solutions et leur confère la valeur *optima* observée en milieu tamponné (27). [Cette observation fournit un moyen commode pour déterminer la valeur maxima de l'activité hémolytique de nos échantillons très actifs de toxine *perfringens* précipitée : il suffit, en effet, d'ajouter 1 p. 1.000 de cys-

(25) Le pH des solutions de toxine dans l'eau physiologique varie, suivant les échantillons, entre 5,6 et 5,8 ; les toxines dissoutes dans un mélange tampon de pH 6 abaissent le pH à 5,9 ou 5,95.

(26) Le pH des solutions de toxine dans les bouillons employés a été de 6,85. La D.M.H. des échantillons de toxine que nous avons étudiés au cours de ces recherches était, dans l'eau physiologique, comprise entre 0 milligr. 002 et 0 milligr. 0004.

(27) Par exemple, la D.M.H. de la toxine E 8 est de 0 milligr. 005 lorsque la dissolution est effectuée dans de l'eau physiologique ou dans du bouillon Vf ; elle est de 0 milligr. 0015 lorsque le solvant est soit du bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de cystéine, soit une solution tampon de pH 6. La D.M.H. de la toxine E 42 est de 0 milligr. 002 dans l'eau physiologique ou dans du bouillon Vf ; 0 milligr. 0005 ou 0 milligr. 0006 dans du bouillon Vf + cystéine ou dans une solution-tampon pH 6 ; celle de la toxine E 36 est de 0 milligr. 0009, 0 milligr. 0006 ou 0 milligr. 0004 suivant que la solution est faite avec de l'eau physiologique, dans du bouillon ou dans du bouillon + cystéine. (Au cours de ces titrages, les dilutions sont effectuées avec de l'eau physiologique lorsque les toxines sont dissoutes dans de l'eau physiologique ou dans du bouillon ; dans les autre cas, avec la solution des phosphates qui a servi à dissoudre la toxine.)



téine à la toxine dissoute dans du bouillon Vf (28) et d'évaluer trente à soixante minutes plus tard l'activité hémolytique de la solution. Ce procédé est plus rapide que celui qui consiste à rechercher les conditions optima de l'activité de la toxine dissoute à différents pH dans des solutions-tampons de phosphates.]

Nous nous sommes demandé si les diverses observations que nous avons notées en évaluant l'activité hémolytique de la toxine *perfringens* étaient transposables à la toxine histolytique précipitée. Dans une première série d'essais nous avons recherché si la toxine histolytique dissoute dans du bouillon Vf additionné de cystéine était plus hémolytique qu'en solution dans l'eau physiologique. Nous avons examiné 5 échantillons à ce point de vue : H1, H2, H6, H8, H9. De chaque échantillon nous avons préparé simultanément deux solutions contenant 1 milligramme de toxine par centimètre cube, l'une dans de l'eau physiologique, l'autre dans du bouillon Vf ; trente minutes plus tard nous avons ajouté à une partie de chaque solution conservée à la température du laboratoire, 1 p. 1.000 de chlorhydrate de cystéine (c'est-à-dire 1 milligramme par centimètre cube) et au bout de trente minutes nous avons déterminé l'activité hémolytique des différentes solutions (29). Nous avons constaté que la cystéine ne modifie par l'effet hémolytique des échantillons de toxine histolytique dissous dans l'eau physiologique mais qu'elle confère aux 5 échantillons mis en solution dans du bouillon Vf une activité hémolytique supérieure à celle qu'ils manifestent dans l'eau physiologique. Voici en effet les valeurs respectives de la dose minima hémolytique des toxines H1, H2, H6, H8 et H9 mises en solution : dans de l'eau physiologique (30), 0,04, 0,04, 0,06, 0,07, 0 milligr. 03 ; dans du bouillon + cystéine (31), 0,02, 0,01, 0,03, 0,02, 0 milligr. 02.

Ces chiffres indiquent qu'il faut, par exemple, 0 milligr. 07 de la toxine H8 en solution dans l'eau physiologique pour

(28) En titrant 3 toxines dissoutes comparativement dans 3 bouillons Vf préparés à des dates différentes, nous avons obtenu les mêmes résultats.

(29) Au cours de ces titrages, toutes les dilutions sont effectuées avec de l'eau physiologique.

(30) Le pH des solutions obtenues a varié entre 6,6 et 6,8.

(31) Le pH des solutions a été de 6,8 et 6,85.

hémolyser 0 c. c. 1 de globules de mouton à 5 p. 100 et qu'il suffit de 0 milligr. 02 de la même toxine, en solution dans du bouillon Vf + cystéine, pour déterminer la même hémolyse. L'ensemble des résultats obtenus dans les mêmes conditions montre que, dans l'eau physiologique, la dose minima hémolytique des échantillons mentionnés étant comprise entre 0,07 et 0 milligr. 04, ils paraissent contenir 14 à 25 doses hémolytiques par milligramme ; en présence de cystéine et de bouillon Vf leurs doses minima hémolytiques varient de 0,03 à 0 milligr. 01 ; ils contiennent donc 33 à 100 doses hémolytiques par milligramme. De ces données, il ressort incontestablement que les échantillons de toxine histolytique examinés sont plus hémolytiques dans le bouillon Vf additionné de cystéine que dans l'eau physiologique.

Dans une autre série d'essais analogues nous avons dissous les toxines dans un bouillon Vf plus alcalin que celui de l'expérience précédente (32). En l'absence de cystéine les échantillons de toxine ci-dessus ont été moins hémolytiques dans ce bouillon que dans l'eau physiologique. Les toxines H2, H6, H9, par exemple, n'ont hémolysé 0 c. c. 1 de globules à 1 p. 20 qu'aux doses respectives de 0,1, 0,4 et 0 milligr. 1 (33). Mais en présence de cystéine chacune des toxines H1, H2, H6, H8 et H9 a été aussi hémolytique dans ce bouillon que dans le bouillon additionné de cystéine de la

(32) Suivant les échantillons examinés, le pH de ce bouillon après addition de 1 p. 1.000 de toxine a été de 7,2 ou 7,3 et le pH du même bouillon additionné de 1 p. 1.000 de toxine et de 1 p. 1.000 de cystéine a varié entre 7,05 et 7,15.

(33) Nous avons utilisé aussi ce bouillon pour dissoudre une toxine *perfringens* dont l'activité hémolytique est comparable à celle de nos échantillons de toxine histolytique : la toxine P1 préparée à Copenhague. Le pH de la solution contenant, par centimètre cube, 1 milligramme de cette toxine, est de 7,3. En l'absence de cystéine, la D.M.H. de la toxine P1, dissoute dans ce bouillon, est de 0 milligr. 2 et en présence de 1 p. 1.000 de cystéine : 0 milligr. 02 (pH de la dernière solution 7,05). En solution dans l'eau physiologique la D.M.H. de la toxine P1 est seulement de 0 milligr. 08. Ces résultats indiquent que l'activité hémolytique de la toxine P1, de même que celle de nos échantillons de toxine *perfringens* ou histolytique, est plus faible dans l'eau physiologique que dans le bouillon Vf additionné de cystéine. (Nous avons vérifié que le bouillon Vf + 1 p. 1.000 de chlorhydrate de cystéine n'exerce pas d'effet hémolytique sur les globules de mouton.)



première expérience. Ainsi, dans l'un ou l'autre des bouillons utilisés comme solvant, la cystéine intensifie l'activité hémolytique des échantillons de toxine histolytique dont la dose minima hémolytique dans l'eau physiologique varie de 0,04 à 0 milligr. 07 (34).

En comparant ensuite l'activité hémolytique de 2 échantillons de toxine histolytique dissous dans de l'eau physiologique et dans une solution-tampon de pH 7,2 (35), nous avons constaté que l'effet hémolytique de ces toxines (H1 et H9) est plus accentué dans la solution-tampon que dans l'eau physiologique et qu'il est égal à celui des solutions faites dans des bouillons Vf additionnés de cystéine. Ils hémolysent, en effet, à la dose de 0 milligr. 02 les globules employés. Puis nous avons observé que la cystéine n'augmente pas l'effet hémolytique des deux toxines dans la solution-tampon indiquée.

Après ces premiers résultats nous avons systématiquement recherché à *différents pH* la valeur de la dose minima hémolytique de nos divers échantillons de toxine précipitée, dans le but de préciser les conditions optima de l'activité hémolytique de la toxine du *B. histolytique*. Afin d'étudier aussi la stabilité de cette toxine en solution tamponnée, nous avons titré les diverses solutions, maintenues à la température du laboratoire, trente minutes, une heure et cinq heures après leur préparation. Nous les avons ensuite placées à 2° et titrées vingt heures plus tard.

*Solutions employées.* — Nous avons utilisé 6 mélanges-tampons, tels qu'après les avoir additionnés de 1 p. 1.000 de toxine histolytique, le

(34) Les résultats que nous avons obtenus en déterminant la D.M.H. des échantillons H 4, H 7 et H 10 dissous comparativement dans de l'eau physiologique et dans du bouillon Vf additionné de cystéine montrent que l'activité des toxines extrêmement peu hémolytiques dans l'eau physiologique n'est pas renforcée par la cystéine en solution dans du bouillon Vf. Dans les deux cas, la D.M.H. respective de ces échantillons est de 0 milligr. 8, 0 milligr. 6, 0 milligr. 25.

(35) Comme solution-tampon, nous avons utilisé un mélange de phosphates disodique et monopotassique ; pour la préparer, nous avons employé, d'après les directives de Sørensen, 73 cent. cubes de phosphate disodique M/15 et complété à 100 cent. cubes avec une solution de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/15 ; après addition de 1 p. 1.000 de toxine le pH devient égal à 7,15 et après addition supplémentaire de cystéine, à 7,05.

pH des solutions obtenues était égal à 6, 6,6, 6,85, 7,5, 8 et 8,2. Nous les avons préparés en mélangeant en proportions variables des solutions de phosphates disodique M/15 et monopotassique M/15. Les solutions M/15 des deux phosphates ont été faites soit avec de l'eau distillée, soit avec de l'eau physiologique. Comme dans nos expériences sur l'hémolysine du *B. perfringens*, nous avons préparé les mélanges alcalins avec les phosphates en solution dans l'eau distillée (nous avons vérifié qu'ils n'hémolysaient pas les globules de mouton) ; mais pour obtenir des mélanges acides sans effet sur les hématies, nous avons dû faire usage de phosphate disodique M/15 et de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  M/15 en solution dans l'eau physiologique.

Pour réaliser les expériences projetées, nous avons procédé ainsi : chaque échantillon de toxine histolytique à étudier est dissous à la température du laboratoire et à la concentration de 1 p. 1.000 dans les 6 mélanges-tampons préparés juste avant l'expérience. Au cours du titrage, chaque solution est diluée avec le mélange-tampon correspondant. Par exemple, pour déterminer à pH 6 la dose minima hémolytique de la toxine H6 nous dissolvons cette toxine dans un mélange de phosphates monopotassique et disodique de pH 6 ; la solution de la toxine dans ce tampon est ensuite diluée avec le tampon de pH 6 ; puis la toxine est répartie par quantités décroissantes dans une série de tubes ; on complète à 0 c. c. 9 avec le tampon pH 6 et on ajoute 0 c. c. 1 de globules à 5 p. 100. Dans les tubes témoins on met 0 c. c. 9 de tampon pH 6 et 0 c. c. 1 de la même suspension globulaire. Les tubes sont portés à 38° et examinés comme dans les expériences antérieures.

RÉSULTATS OBTENUS. — Nous groupons une partie de nos résultats dans le tableau III. L'ensemble des titrages que nous avons effectués à différents pH (6, 6,6, 6,85, 7,15, 7,5, 8 et 8,2) indique les faits suivants :

1° L'hémotoxine du *B. histolytique* dissoute dans les mélanges de phosphate disodique et monopotassique exerce son effet le plus intense à pH 7,15—7,5. L'examen des résultats des dosages effectués une heure après la dissolution des toxines montre en effet, qu'à pH 7,5, il suffit d'employer 0 milligr. 03 de la toxine H6 par exemple pour hémolyser 0 c. c. 1 de globules à 5 p. 100 ; à pH 6,6, 6,85 ou 8 il faut 0 milligr. 05 de cette toxine pour produire le même effet et à pH 8,2 il faut en utiliser 0 milligr. 1. De même, l'activité hémolytique maxima des toxines H2 et H8 se manifeste à pH 7,5. A ce pH les trois toxines mentionnées (H6, H2 et H8), titrées trente ou soixante minutes après leur dissolution, hémolysent 0 c. c. 1 de globules respectivement aux doses de 0,03, 0,01, 0 milligr. 03. Nous avons signalé précédemment



TABLEAU III. — Influence du pH sur l'activité hémolytique et la stabilité de 4 échantillons de toxine histolytique dissous dans des mélanges en proportions variables de phosphates monopotassique et disodique  $\frac{M}{15}$ .

pH de la solution de la toxine	AVANT D'ÊTRE TITRÉE la solution est maintenue pendant	ÉCHANTILLONS DE TOXINE HÉMOLYTIQUE			
		II <sub>2</sub>	II <sub>3</sub>	II <sub>8</sub>	II <sub>9</sub>
6	30 minutes à 20°.	0,04	0,05		0,1
	1 h. à 20°.	0,04	0,06	0,06	0,1
	5 h. à 20°.	0,06	0,09	0,09	0,2
	5 h. à 20° et 20 h. à 2°.	0,09	0,2	0,2	0,2
	24 h. à 2°.	0,1	0,2		0,2
6,6	1 h. à 20°.	0,05	0,05	0,07	0,1
	5 h. à 20°.	0,06	0,09	0,09	0,2
	5 h. à 20° et 20 h. à 2°.	0,09	0,2	0,3	0,2
6,85	1 h. à 20°.	0,03	0,05	0,08	0,06
	5 h. à 20°.	0,04	0,08	0,1	0,1
	5 h. à 20° et 20 h. à 2°.	0,07	0,09	0,3	0,2
	24 h. à 2°.	0,08		0,3	0,2
7,5	1 h. à 20°.	0,01	0,03	0,03	0,05
	5 h. à 20°.	0,02	0,04	0,06	0,05
	5 h. à 20° et 20 h. à 2°.	0,03	0,08	0,2	0,07
	48 h. à 2°.		0,5		
8	30 minutes à 20°.		0,04		0,05
	1 h. à 20°.	0,02	0,05	0,1	0,05
	5 h. à 20°.	0,03	0,07	0,2	0,06
	5 h. à 20° et 20 h. à 2°.	0,04	0,2	0,7	0,07
8,2	1 h. à 20°.	0,07	0,1	0,2	0,06
	5 h. à 20°.	0,1	0,2	0,9	0,1
	5 h. à 20° et 20 h. à 2°.	0,1	0,3	1 c. c. n'hémolyse pas les globules.	0,15

qu'à pH 7,15 les toxines H1 et H9 dissoutes dans un mélange de phosphates hémolysaient la même quantité de globules à la dose de 0 milligr. 02. Si nous rapprochons ce groupe de résultats de ceux que nous avons obtenus au cours des recherches effectuées avec du bouillon, nous constatons que 4 toxines histolytiques sur 5 en solution à pH 7,15 ou 7,5 dans des mélanges-tampons sont aussi hémolytiques que dans du bouillon Vf additionné de 1 p. 1.000 de cystéine ; la cinquième a une activité légèrement inférieure.

2° L'hémotoxine histolytique est instable dans les solutions

de phosphates. En effet, à des pH compris entre 6 et 8, l'activité de la plupart des toxines diminue de 30 p. 100 environ en cinq heures à 20° (36) et de 50 à 85 p. 100 en vingt-quatre heures ; à pH 8,2, 3 toxines (H6, H8, H9) perdent même 40 à 78 pour 100 de leur activité en cinq heures seulement à 20°.

D. M. H. de la toxine H2 . . . . .	à pH 6	à pH 8
1 heure après la dissolution à 20° .	0,04	0,02
5 heures après la dissolution à 20° .	0,06	0,03
20 heures plus tard . . . . .	0,09	0,04

D. M. H. de la toxine H8 . . . . .	à pH 6	à pH 8	à pH 8,2
1 heure après la dissolution à 20° .	0,06	0,01	0,2
5 heures après la dissolution à 20° .	0,09	0,02	0,9
20 heures plus tard . . . . .	0,2	0,7	

Dans une autre série d'essais semblables nous avons étudié la stabilité de l'hémotoxine histolytique à 2° ; les toxines, en solution dans les mélanges-tampons utilisés au cours de l'expérience que nous venons de rapporter, ont été titrées trente minutes après leur préparation puis conservées à 2°. Les titrages effectués cinq, vingt-quatre et quarante-huit heures plus tard, ont montré que l'hémotoxine histolytique est instable même à 2°. Voici un exemple : pour hémolyser la quantité habituelle de globules, il suffit de 0 milligr. 03 de la toxine H6 fraîchement dissoute (pH 7,5) ; il faut 0 milligr. 1 de la même toxine après vingt-quatre heures de conservation à 2° et 0 milligr. 5 au bout de quarante-huit heures. Nous avons ensuite constaté que le chlorhydrate de cystéine (1 p. 1.000), employé tel quel ou en présence de bouillon, n'augmente pas l'activité hémolytique des solutions atténuées.

En résumé, les échantillons de toxine histolytique qui contiennent au moins 15 doses hémolytiques par milligramme sont plus hémolytiques en solution dans du bouillon Vf additionné de cystéine qu'en solution dans l'eau physiologique ;

(36) L'activité hémolytique des 5 échantillons de toxine *perfringens* précipitée que nous avons étudiés dans les mêmes conditions est restée stable à pH 6, 6,5, 7 et 7,5 pendant cinq heures à 20°.



dissous dans des mélanges de phosphates monopotassique et disodique M/15, ils présentent leur activité hémolytique maxima à pH 7,15—7,5 ; les solutions préparées depuis peu de temps dans ces conditions sont en général aussi hémolytiques que les solutions effectuées dans des bouillons Vf additionnés de cystéine. Même à 2° l'hémotoxine histolytique est instable dans les solutions de phosphates.

DISCUSSION DES RÉSULTATS. — Nos recherches antérieures sur la toxine *perfringens* liquide ont montré que des substances *réductrices* telles que la cystéine et le glutathion rétablissent l'activité hémolytique des échantillons de toxine *atténués* (voir page 399). Les recherches actuelles sur l'hémotoxine histolytique précipitée établissent que certains échantillons de toxine histolytique en solution dans du bouillon Vf additionné de cystéine (pH 6,8—6,85) sont *plus hémolytiques* que les solutions effectuées à pH 6,6—6,8 dans de l'eau physiologique ou à pH 6,85 dans des mélanges de phosphates. Le rapprochement de ces deux groupes de faits incite à penser, pour expliquer les derniers résultats, que les échantillons de toxine histolytique examinés ont perdu une partie de leur activité pendant les diverses phases de leur préparation (précipitation, essorage, dessiccation à la température du Laboratoire) et que la cystéine, en raison de son pouvoir réducteur, active l'hémolysine atténuée et ainsi confère aux solutions de toxine dans le bouillon un titre supérieur à celui des solutions de toxine dans l'eau physiologique. Mais les résultats des expériences montrant que l'effet hémolytique des toxines à pH 7,15 ou 7,5, en milieu simplement tamponné, est égal à celui des solutions préparées dans du bouillon Vf + cystéine indique que l'hypothèse envisagée n'est pas plausible.

Après avoir ainsi éliminé l'hypothèse de l'activation de l'hémotoxine histolytique par la cystéine, nous nous sommes reportée aux résultats mettant en évidence que l'action hémolytique de cette toxine diminue rapidement dans les solutions tamponnées et pour expliquer le fait que le titre hémolytique des toxines dissoutes à pH 6,8—6,85 dans du bouillon Vf additionné de cystéine est plus élevé que celui des mêmes toxines titrées simultanément à pH 6,6—6,85 en présence

d'eau physiologique ou de phosphates, nous avons alors supposé que l'hémotoxine histolytique, au cours du titrage, devait être plus stable dans du bouillon additionné de cystéine que dans des solutions au même pH de chlorure de sodium ou de phosphates monopotassique et disodique. Dans un but de contrôle, nous avons dissous plusieurs toxines (H2, H6, H8 et H9) dans du bouillon Vf additionné de cystéine et déterminé au bout d'une heure et cinq heures l'activité hémolytique des différentes solutions conservées à 20°. Les titrages ont révélé que l'hémotoxine histolytique dissoute en présence de cystéine dans du bouillon Vf reste parfaitement stable pendant cinq heures à 20°. Après cette observation, les solutions ont été placées à 2° ; en les titrant vingt heures plus tard nous avons constaté que leur activité hémolytique n'avait pas diminué. Ainsi à l'instabilité de l'hémotoxine histolytique dans les solutions de phosphates M/15 s'oppose la stabilité des solutions effectuées dans du bouillon Vf + cystéine (37). Le fait que la cystéine ne rétablit pas le titre hémolytique des toxines ayant perdu une grande partie de leur activité dans les solutions de phosphates, indique que l'hémotoxine histolytique conservée dans de telles conditions subit une altération irréversible et non une simple atténuation réversible. De l'ensemble de ces données nous déduisons que pour évaluer l'*activité hémolytique maxima* d'une toxine dissoute dans un mélange de phosphates, il est nécessaire de titrer plusieurs fois, à de courts intervalles, la solution fraîchement préparée et de comparer les résultats obtenus au titre de la toxine dissoute dans du bouillon additionné de cystéine.

b) **POUVOIR ANTIGÈNE DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE LIQUIDE, DE LA TOXINE FORMOLÉE ET DE LA TOXINE PRÉCIPITÉE.** — Les divers échantillons de toxine histolytique liquide que nous avons titrés ont souvent été divisés en 3 lots : l'un a été conservé à 2°, un autre transformé en anatoxine par addition de formol et le reste saturé de sulfate neutre d'ammonium pour précipiter la toxine. Nous avons comparé le pouvoir antigène de la toxine

(37) Nous nous proposons de rechercher si la toxicité des différentes solutions subit les mêmes variations que l'action hémolytique.



liquide, de l'anatoxine (38) et de la toxine précipitée. Pour cela, nous avons évalué fréquemment le taux des anticorps que l'injection sous-cutanée de ces substances fait apparaître dans le sérum de nombreux chevaux normaux soumis à l'un des trois procédés d'immunisation suivants :

**Premier procédé :** Il consiste à injecter des doses croissantes de toxine *histolytique liquide* à des chevaux préalablement vaccinés par 3 ou par 5 injections d'anatoxine histolytique.

**PREMIER CAS :** Les chevaux sont préparés par 3 vaccinations préalables d'anatoxine (25, 50 et 100 cent. cubes) ; ils reçoivent ensuite les quantités suivantes de toxine : 10, 25, 50, 100, 200, 300, 350, 400, 500 cent. cubes ; l'intervalle entre toutes les injections est de sept jours ; la toxine utilisée contient 150 à 200 doses mortelles par centimètre cube et, suivant les chevaux auxquels elle est destinée, elle est ou non additionnée de 5 à 10 p. 1.000 de tapioca stérile (39).

**DEUXIÈME CAS :** Les chevaux reçoivent à sept jours d'intervalle 5 vaccinations préalables d'anatoxine (25, 50, 100, 150, 250 cent. cubes) ; ils sont ensuite soumis à des injections hebdomadaires de toxine additionnée ou non de tapioca (25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 450, 500 cent. cubes).

**Deuxième procédé :** Les chevaux sont traités uniquement par des injections sous-cutanées d'anatoxine *histolytique* préparée par addition de 5 p. 1.000 de formol à des toxines contenant 150 à 200 D. M. par centimètre cube (doses injectées à sept jours d'intervalle : 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 cent. cubes, avec ou sans tapioca).

(38) Après les premières recherches de Weinberg et Prévot (*C. R. de l'Acad. des Sc.*, 179, 1924, p. 227), montrant que les injections de toxines formolées (histolytique et vibriion septique), faites à des chevaux déjà immunisés avec des toxines ordinaires, permettent de préparer des sérums aussi bons que ceux obtenus lors de l'emploi des toxines non formolées (titrages sur lapins, vis-à-vis d'une dose mortelle de la toxine correspondante), Weinberg et Barotte ont signalé que le titre antitoxique moyen des sérums prélevés après injection d'anatoxine histolytique est nettement plus faible que celui des sérums fournis par les chevaux immunisés avec la toxine histolytique. De leurs observations Weinberg et Barotte ont conclu que le formol altère le pouvoir antigène de la toxine histolytique. Au cours du même travail ils ont, en outre, constaté que l'activité antigénique de la toxine vibriion septique est affaiblie aussi par le formol, mais à un moindre degré que celle de la toxine histolytique (ces *Annales*, 43, 1929, p. 452).

(39) Dès 1925, G. Ramon a montré que les injections d'anatoxine diphtérique additionnée de tapioca déterminent l'hyperimmunisation rapide des chevaux (*C. R. Acad. des Sc.*, 181, p. 157 ; *C. R. Soc. de Biol.*, 93, p. 506).

**Troisième procédé :** Injection, tous les quatorze jours, de doses croissantes de *toxine histolytique précipitée* et de bacilles histolytiques vivants, le tout enrobé de lanoline. Les doses de toxine successivement injectées ont été de : 100, 200, 300, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 doses mortelles (40).

A partir du moment où l'immunisation déclenchée par l'un quelconque de ces procédés atteint un degré suffisant, les chevaux ne reçoivent alors qu'une injection d'entretien, faite toutes les cinq semaines, et ils subissent, neuf jours après cette injection, une saignée de 6 litres et quatre jours après celle-ci, une autre saignée de 6 litres également ; l'injection d'entretien est de 500 cent. cubes de toxine, de 500 cent. cubes d'anatoxine ou de 6.000 doses mortelles de *toxine précipitée* suivant que les chevaux ont été immunisés par le premier, le deuxième ou le troisième procédé.

**RÉSULTATS OBSERVÉS.** — Quel que soit le procédé mis en œuvre, l'immunisation s'établit en général lentement. Voici le titre antitoxique maximum (41) atteint par quelques-uns des sérums prélevés aux chevaux des différentes séries :

Quatre chevaux immunisés par le premier procédé (injection de toxine liquide) ont fourni des sérums dont le titre a été de 300 à 400 unités internationales après 10 injections (cheval 552) et de 400 à 500 unités internationales après 13 et 17 injections (chevaux 387, 389, 26).

Le titre maximum du sérum des chevaux 782 et 485 immunisés par le deuxième procédé (injection d'anatoxine) a été de 300 et 300 à 400 unités internationales après 12 injections.

Par le troisième procédé, nous avons obtenu des sérums contenant 400 à 450 unités par centimètre cube après 5 et 8 injections (chevaux 553 et 497) ; 600 unités internationales après 5 injections (cheval 62).

Après avoir atteint un maximum, l'immunisation des chevaux anti-histolytique, de même d'ailleurs que celle de tout cheval producteur d'un sérum thérapeutique, subit une diminution progressive, puis se stabilise à un taux moyen. Lorsque le titre antitoxique du sérum des chevaux traités depuis longtemps par la toxine histolytique enrobée dans la lanoline a présenté une valeur stable, nous avons remplacé l'injection d'entretien — antigène + lanoline — soit par 2 injections d'anatoxine, l'une de 200 cent. cubes et l'autre de 300 cent. cubes, soit par une seule injection de 500 cent. cubes d'anatoxine liquide ; cette substitution a déterminé un accroissement net de la teneur des sérums en antitoxine. En effet : le titre des sérums 502 et 492, par exemple, a passé de 100 unités à 400 et 450 unités ; celui des sérums 448 et 554 s'est élevé de 50 à 200-300 unités internationales.

(40) La dose mortelle est déterminée par injection intraveineuse à des souris de 17 à 20 grammes.

(41) Titrages réalisés sur souris avec une « dose-test » de la toxine histolytique H 2 ou de la toxine H 5 ; une « dose-test » de H 2 représente ainsi que nous le verrons plus loin 60 doses mortelles et une « dose-test » de H 5 : 55 doses mortelles pour des souris de 17 à 20 grammes.



Les résultats ci-dessus indiquent que les trois méthodes d'immunisation que nous avons appliquées à des chevaux normaux permettent d'obtenir des sérums anti-histolytiques de titre antitoxique satisfaisant. Nous en déduisons que l'anatoxine histolytique préparée par addition de formol à des toxines histolytiques de titre élevé possède incontestablement une valeur antigène manifeste (42).

C) VALEUR DE LA « DOSE-TEST » DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE. —

Nous avons déterminé comparativement avec deux sérums étalons, danois et français, la « dose-test » de 12 échantillons de toxine histolytique (43). Les chiffres du tableau IV attestent que les résultats obtenus au cours des déterminations faites avec le sérum danois concordent parfaitement avec les titrages réalisés avec le sérum étalon français que nous avons préparé. En effet, quel que soit le sérum-étalon utilisé, la « dose-test » de la toxine H 1 est de 1 milligr. 6 ; celle de la toxine H 2 : 2 milligr. 1 ; celle de la toxine H 3 : 0 milligr. 33 ; celle de la toxine H 4 : 1 milligr. 1 ; celle de la toxine H 7 : 1 milligr. 5, et celle de la toxine H 10 : 4 milligr. 15.

Nous en concluons que nous pourrions à l'avenir déterminer la « dose-test » de nos échantillons de toxine uniquement avec notre sérum étalon.

Si nous groupons les échantillons de toxine histolytique qui sont comparables par la valeur de la dose minima mortelle

(42) D'après nos recherches, l'anatoxine vibron septique, préparée par addition de formol à des toxines acides très antigéniques, n'a qu'un faible pouvoir antigène. En effet, après 10 injections effectuées à 16 chevaux, le sérum le plus antitoxique obtenu a seulement titré 50 unités (pH des toxines avant addition de 5 p. 1.000 de formol : 5,3-6,3 ; toxicité avant formolage : 200 doses mortelles par centimètre cube).

Il conviendrait de reprendre nos essais avec des anatoxines préparées en milieu neutre afin d'établir si la valeur antigène de la toxine vibron septique n'est altérée par le formol qu'en milieu acide.

(43) Rappelons que, pour déterminer la « dose-test » d'une toxine histolytique, nous avons suivi le protocole qui nous a servi à préciser celle de nos échantillons de toxine *perfringens* : chaque souris au cours des titrages reçoit, en injection intraveineuse et sous le volume de 0 c. c. 5, une unité antitoxique du sérum étalon et un poids connu de toxine en solution dans l'eau physiologique. Pour chaque dose de toxine essayée, nous injectons 4 à 8 souris de 17 à 20 grammes.

nous voyons qu'ils diffèrent souvent par la valeur de la « dose-test ». Ainsi la « dose-test » des toxines H 2, H 7 et H 10 est respectivement de 2 milligr. 1, 1 milligr. 5 et 1 milligr. 15 ; la valeur de leur dose minima mortelle est de 0 milligr. 035 ou 0 milligr. 03 ; il s'ensuit qu'une dose-test de ces toxines ne contient pas le même nombre de doses mortelles.

TABLEAU IV. — Valeurs comparées de la « dose-test » de différents échantillons de toxine histolytique titrés avec un sérum étalon danois ou avec un sérum étalon français.

ÉCHANTILLON de toxine	DOSE minima mortelle	DOSE minima hémolytique	« DOSE-TEST » déterminée avec un sérum étalon		NOMBRE de doses mortelles dans une « dose-test danoise »
			DANOIS	FRANÇAIS	
	(milligr.)	(milligr.)	(mil mgr.)	(milligr.)	
H <sub>1</sub> . . . . .	0,04	0,04	1,6	1,6	40
H <sub>2</sub> . . . . .	0,035	0,04	2,1	2,1	60
H <sub>3</sub> . . . . .	0,02		0,55	0,55	27,5
H <sub>4</sub> . . . . .	0,025	0,8	1,1	1,1	44
H <sub>5</sub> . . . . .	0,015	1,5	0,83	0,8	55,3
H <sub>6</sub> . . . . .	0,04	0,06	1,85	1,8	46,2
H <sub>7</sub> . . . . .	0,03	0,6	1,5	1,5	50
H <sub>8</sub> . . . . .	0,045	0,07	1	0,9	22,2
H <sub>9</sub> . . . . .	0,018	0,05	0,7	0,6	38,8
H <sub>10</sub> . . . . .	0,03	0,25	1,15	1,15	38,3
H <sub>12</sub> . . . . .	0,03		1,1	1	36,6
H <sub>13</sub> . . . . .	0,03		1,15	1,05	38,3

Les chiffres de la dernière colonne du tableau IV indiquent que le nombre de doses mortelles contenues dans une « dose-test » des 12 échantillons de toxine que nous avons titrés est compris entre 22 et 60. Tandis que les 3 échantillons H 9, H 10 et H 13 représentent sensiblement le même nombre de doses mortelles (38,8 ou 38,3), les 9 autres diffèrent notablement. En effet :

## DOSES MORTELLES

1 « dose-test » de la toxine H 1 . . . . .	40
1 « dose-test » de la toxine H 2 . . . . .	60
1 « dose-test » de la toxine H 3 . . . . .	27,5
1 « dose-test » de la toxine H 4 . . . . .	44
1 « dose-test » de la toxine H 5 . . . . .	55,3
1 « dose-test » de la toxine H 6 . . . . .	46,2
1 « dose-test » de la toxine H 7 . . . . .	50
1 « dose-test » de la toxine H 8 . . . . .	22,2
1 « dose-test » de la toxine H 12 . . . . .	36,6



Une « dose-test » de toxine histolytique, de même qu'une « dose-test » des toxines *perfringens* et *vibron* septique, ne représente donc pas un nombre constant de doses mortelles.

**DÉTERMINATION DU TITRE ANTITOXIQUE  
DES SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES  
AVEC DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS  
DE TOXINE HOMOLOGUE**

**1° TITRAGES AVEC UNE « UNITÉ » DE TOXINE.**

Nous avons titré deux sérums avec les toxines H 1, H 2, H 3 et H 4. Les résultats obtenus avec la première et la dernière ont été voisins, mais différents de 30 et 50 p. 100 et parfois même davantage de ceux trouvés en employant les deux autres.

Les titrages effectués avec 20 doses mortelles de divers échantillons de toxine ne permettent donc pas de déterminer avec une approximation convenable le titre antitoxique des sérums anti-histolytiques.

**2° TITRAGES AVEC UNE « DOSE-TEST » DE TOXINE.**

Nous avons évalué le pouvoir antitoxique de 4 sérums vis-à-vis de nos 7 premiers échantillons de toxine (H 1..... H 7) et celui de deux autres vis-à-vis des 4 échantillons H 1, H 2, H 3, H 4 ; nous groupons une partie de nos résultats dans le tableau V. Pour effectuer les déterminations, nous avons procédé comme pour le titrage des sérums anti-*perfringens* (44) et anti-*vibron* septique.

Avant de signaler nos observations, nous rappellerons brièvement les faits suivants :

(44) Le mélange de toxine et de sérum injecté à chaque souris contient une « dose-test » de toxine (en solution dans l'eau physiologique) et un volume connu du sérum à expertiser ; le mélange est laissé pendant une heure à 37° avant d'être injecté par voie veineuse. Ces *Annales*, 66, 1941, p. 229, tableau IV.

En recherchant le titre d'un sérum anti-histolytique avec une « dose-test » de 2 toxines correspondantes, White, O'Brien, Petrie et aussi H. W. Glotova et Ostrovskaja ont obtenu les mêmes chiffres. Walbum et Reymann ont observé des résultats concordants en titrant 5 sérums vis-à-vis de la « dose-test » de 3 échantillons de toxine histolytique préparés en Allemagne, au Danemark et en France (45). Tous ces titrages ont été effectués par le procédé des injections intraveineuses à la souris. La concordance des résultats obtenus parle en faveur de la méthode de titrage utilisée mais, cependant, n'autorise pas encore à porter un jugement définitif sur son degré de précision ; le nombre d'observations rapportées apparaît, en effet, nettement insuffisant dès qu'on envisage les faits notés lors du titrage des sérums anti-*perfringens* : nous avons montré que les résultats satisfaisants obtenus au cours du titrage d'un même sérum avec une « dose-test » de 3 échantillons de toxine *perfringens* peuvent différer énormément de ceux que fournissent les titrages effectués comparativement avec plusieurs autres toxines homologues (46).

Nous avons en outre indiqué que les résultats du titrage des sérums anti-vibrien septique ne sont pas concordants d'une manière constante (47). Aussi avons-nous recherché le titre antitoxique de quelques sérums anti-histolytiques vis-à-vis de 7 de nos échantillons de toxine histolytique (tableau V).

Le nombre total des signes + et —, inscrits sous quelques chiffres, indique le nombre de souris injectées par dose de sérum essayée ; les souris mortes sont indiquées par le signe + et les souris ayant survécu, par le signe — (souris de 17 à 20 grammes, injections intraveineuses).

De l'ensemble des résultats du tableau V, il ressort que *les titres antitoxiques d'un même sérum anti-histolytique déterminés avec une « dose-test » de 7 échantillons de toxine homologue diffèrent au plus de 16 p. 100.*

Le sérum 340, par exemple, titre 400 unités lorsque le titrage est fait avec la toxine H 6, entre 400 et 450 unités d'après les

(45) Voir le rapport de JENSEN (Claus). *Bull. Trim. de l'Organ. d'Hyg. Soc. des Nat.*, novembre 1936, p. 720-756.

(46) Par exemple le sérum anti-*perfringens* 415 (saignée du 4 novembre 1934) titre 450 unités lorsque le dosage est effectué avec les toxines E 14, E 22, E 35 ; il titre 700, 350, 200 à 250, ou 50 à 60 unités d'après les titrages effectués respectivement avec les toxines E 16, E 33, E 34 ou E 26. Le sérum 376 (saignée du 9 décembre 1938) contient 450 à 500 unités d'après le titrage pratiqué avec les toxines E 13 et E 22 et 75 à 100 unités d'après le titrage avec la toxine E 25.

(47) Le titre antitoxique du sérum anti-vibrien septique 341, par exemple, est de 400 unités lorsque le titrage est réalisé avec une « dose-test » des toxines V 6 et V 7, il est de 400 à 450 unités vis-à-vis de la toxine V 5, de 450 à 500 vis-à-vis de la toxine V 2 et seulement de 350 unités vis-à-vis de la toxine V 4 (ces *Annales*, 67, 1941, p. 148 et 149).



TABLEAU V. — Titres antitoxiques de 5 sérums anti-histolytiques.  
 Titrages effectués comparativement avec une « dose-test » de  
 différents échantillons de toxine histolytique.

ÉCHANTILLON de toxine		SÉRUM 308	SÉRUM 340	SÉRUM 345	SÉRUM 343	SÉRUM 502
Numéro	« Dose-test »					
	(milligr.)	(unités)	(unités)	(unités)	(unités)	(unités)
H <sub>1</sub>	1,6	600	450 à 500	750	450	500
H <sub>2</sub>	2,1	500	450 à 500	800 à 850	450 à 475	550
H <sub>3</sub>	0,55	550	450 à 500	800 à 850	450	500
H <sub>4</sub>	1,1	550 à 600	450	700	125 à 150	550 à 600
H <sub>5</sub>	0,83	550 600 ++++	450 500 +++	750 800 +++	125 à 150	
H <sub>6</sub>	1,85	500 550 ++----	400 +++--	750 800 -----		
H <sub>7</sub>	1,5	600 +++---	400 450 +---- +++-	800 ++++---		

titrages effectués avec la toxine H 7 et entre 450 et 500 unités vis-à-vis des toxines H 1, H 2, H 3.

Le sérum 308 titre 600 unités d'après les dosages avec H 1 ou H 7.

Le sérum 308 titre 500 unités d'après les dosages avec H 2.

Le sérum 308 titre 550 unités d'après les dosages avec H 3.

Le sérum 308 titre 550-600 unités d'après les dosages avec H 4 ou H 5.

Les résultats observés au cours du titrage de plusieurs autres sérums ont présenté entre eux des écarts du même ordre. Exemple : le sérum 502 titre 500, 550 ou entre 550 et 600 suivant que la toxine utilisée a été l'échantillon H 1, H 2 ou H 4.

Les discordances entre les résultats obtenus au cours de l'évaluation du titre antitoxique d'un même sérum anti-histolytique n'excédant pas 16 p. 100 alors que les valeurs antitoxiques trouvées pour un même sérum anti-vibrien septique titré avec divers échantillons de toxine homologue peuvent présenter entre elles des écarts atteignant 25 p. 100 et celles d'un même sérum anti-*perfringens* des différences de 50 et

même 80 p. 100 suivant l'échantillon de toxine *perfringens* employé au cours du dosage, l'antitoxine histolytique est parmi les antitoxines examinées celle qui est titrée avec le plus de précision.

## RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

### PRÉPARATION, TITRE ET PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE.

a) Les cultures de *B. histolytique*, effectuées à 37° dans des bouillons Vf de bœuf ou de cheval ajustés à pH 7,5-7,6, contiennent, vingt-deux heures après l'ensemencement, 100 à 300 doses mortelles par centimètre cube (titrages après centrifugation, sur souris de 17 à 20 grammes, injections intra-veineuses).

Le pH des toxines centrifugées varie en général entre 7.2 et 7,5.

Les bouillons Vf additionnés de phosphate bipotassique et de pyruvate de soude fournissent dans la moitié des cas une fois et demie à deux fois plus de toxine que les bouillons Vf ordinaires.

Les peptones Witte et Defresne n'accentuent généralement pas la production de la toxine histolytique dans le bouillon Vf. Le sang desséché de cheval est sans influence sur la toxino-genèse.

b) La valeur moyenne de la dose minima mortelle de la toxine histolytique précipitée par le sulfate d'ammonium est de 0 milligr. 03 (moyenne de 15 préparations) ; chiffres extrêmes : 0 milligr. 015 et 0 milligr. 045 (tableau II).

Le sulfate d'ammonium précipite 37 à 90 p. 100 de la toxine présente dans le liquide soumis à la précipitation.

c) La toxine histolytique liquide contient une *hémolysine* nocive pour les hématies de mouton : des échantillons de toxine qui tuent les souris aux doses de 1/200 ou 1/300 de centimètre cube hémolysent *in vitro* 0 c. c. 1 de globules de mouton à 5 p. 100 aux doses de 0 c. c. 004 à 0 c. c. 002 ; elles contiennent donc 250 à 500 doses hémolytiques par centimètre



cube ; leur effet hémolytique *in vitro*, de même que leur effet *in vivo* disparaît à 100°.

La dose minima hémolytique de nos échantillons de toxine histolytique précipitée, mis en solution dans l'eau physiologique, varie entre 0 milligr. 04 et 1 milligr. 5 (tableau IV) ; l'activité hémolytique des solutions est supprimée par un chauffage de cinq minutes à 100°. La propriété hémolytique de la toxine conservée à l'état sec, à 2°, est très stable.

L'effet hémolytique de la toxine histolytique précipitée, dissoute dans des mélanges de phosphates disodique et monopotassique M/15, présente sa valeur maxima à pH 7,43-7,5. La cystéine n'augmente pas l'action hémolytique de la toxine histolytique en solution dans de l'eau physiologique ; par contre, elle confère à des échantillons très hémolytiques mis en solution dans du bouillon Vf une activité supérieure à celle qu'ils ont dans l'eau physiologique ; ils acquièrent dans ces conditions l'activité hémolytique optima observée en milieu tamponné (0 milligr. 01 à 0 milligr. 03).

L'hémotoxine histolytique, stable dans du bouillon Vf additionné de cystéine, s'altère dans les solutions de phosphates M/15.

d) La toxine histolytique précipitée possède un *pouvoir antigène* aussi prononcé que la toxine histolytique liquide. L'anatoxine histolytique fait également apparaître dans le sérum des chevaux normaux de fortes quantités d'antitoxine histolytique ; elle renforce le degré d'immunisation des chevaux soumis depuis longtemps à des injections de toxine précipitée enrobée de lanoline.

#### VALEUR DE LA « DOSE-TEST » DE LA TOXINE HISTOLYTIQUE.

Au cours de la détermination de la « dose-test » de nombreux échantillons de toxine histolytique, nous avons constaté que les résultats des titrages effectués avec le sérum étalon international concordent *parfaitement* avec ceux que nous avons obtenus avec le sérum étalon français (tableau III).

Nous en concluons que nous pourrions à l'avenir déterminer la « dose-test » de la toxine histolytique uniquement avec notre sérum étalon.

Une « dose-test » de différents échantillons de toxine histolytique ne représente pas un nombre constant de doses mortelles ; d'après nos titrages, elle contient 22 à 60 doses mortelles pour la souris.

DÉTERMINATION DU TITRE ANTITOXIQUE DES SÉRUMS ANTI-HISTOLYTIQUES AVEC DIFFÉRENTS ÉCHANTILLONS DE TOXINE HOMOLOGUE.

Le titre antitoxique d'un sérum anti-histolytique n'est pas rigoureusement indépendant de l'échantillon de toxine utilisé au cours du titrage (tableau V). Les résultats des titrages effectués avec une « dose-test » de divers échantillons de toxine peuvent différer de 16 p. 100.

**SPECTRES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET  
DU SÉRUM NORMAL HUMAIN ET DU SÉRUM PALUDÉEN  
SPECTRES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET  
DES DIFFÉRENTES FRACTIONS PROTÉIDIQUES  
DU SÉRUM**

par R.-O. PRUDHOMME.

*(Institut Pasteur. Service de M. le Professeur Marchoux.)*

**1° INTRODUCTION.**

Si les recherches spectrographiques sur le sérum sanguin sont fort nombreuses, il est malheureusement difficile de les relier entre elles car les auteurs, pour exprimer leurs résultats, quand ils ne se sont pas contentés de simples mesures qualitatives, se sont servis des unités les plus diverses. Les uns emploient le coefficient de réduction ou le coefficient d'absorption, les autres l'opacité ou le coefficient d'extinction, d'autres encore la densité optique. Comme l'a déjà fait remarquer Lecomte du Noüy [1], une telle confusion oblige à des calculs fatigants pour permettre de comparer les résultats. Il nous semble donc utile, avant d'exposer nos recherches, de donner un rapide aperçu des différentes unités employées en spectrophotométrie.

Considérons un rayon lumineux de longueur d'onde  $\lambda$  traversant une cuve d'épaisseur  $d$  cm. contenant la solution dont on veut étudier l'absorption. Ne tenant pas compte de la lumière réfléchie sur les parois terminales de la cuve, soit  $I_0$  l'intensité du flux à son entrée dans la solution et  $I$  l'intensité de ce même flux à sa sortie de la solution. On appelle :

**1° Coefficient de réduction :**

$$r = \frac{I}{I_0}.$$



2° *Opacité* :

$$W = \frac{1}{r} = \frac{I_0}{I}.$$

3° *Densité optique* :

$$\delta = \log_{(10)} \frac{I_0}{I} = \log_{(10)} W = \text{colog. } r.$$

4° *Coefficient d'absorption* :

On le définit par la relation :

$$I = I_0 \cdot e^{-Kd}$$

qui exprime la loi de Lambert. d'où :

$$K = \frac{1}{d} \cdot \log_{(e)} \frac{I_0}{I}.$$

5° *Coefficient d'extinction* :

Il est défini par une relation identique à celle qui sert à déterminer le coefficient d'absorption. La différence consiste à employer les logarithmes vulgaires (base 10) au lieu des logarithmes népériens (base  $e$ ) :

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon d}$$

d'où :

$$\varepsilon = \frac{1}{d} \cdot \log_{(10)} \frac{I_0}{I}.$$

On voit que ce coefficient est numériquement égal à l'inverse de l'épaisseur (en centimètres) capable de réduire l'intensité de la lumière à  $1/10$  de sa valeur.

Remarquons que l'on peut passer facilement du coefficient d'extinction au coefficient d'absorption et inversement. On a en effet :

$$M \cdot K = \varepsilon$$

où  $M$  est le nodule de passage des log. népériens aux log. vulgaires.  $M = 0,434$ .

On a donc :

$$K = 2,30 \cdot \varepsilon$$

et

$$\varepsilon = 0,434 \cdot K.$$

Remarquons aussi que le coefficient d'extinction est iden-

tique à la densité optique  $\delta$  quand celle-ci est prise pour une épaisseur de 1 centimètre. En effet on a :

$$\delta = \log_{(e)} \frac{I_0}{I}$$

$$\varepsilon = \frac{1}{d} \log_{(e)} \frac{I_0}{I} = \frac{1}{d} \cdot \delta$$

d'où :

$$\delta = \varepsilon \cdot d.$$

Comme on le voit, nombreuses sont les unités que l'on peut utiliser pour mesurer l'absorption de la lumière par un corps. Et encore notons qu'ici nous n'avons pas parlé des coefficients d'absorption ou d'extinction moléculaires où l'on fait intervenir la concentration moléculaire des solutions étudiées. En effet, on ne saurait envisager la question de l'absorption du sérum sous cet angle, car si le sérum tient en solution une molécule protéido-lipidique, il est difficile à l'heure actuelle de concevoir cette solution comme étant régie par les lois ordinaires.

Nous nous sommes servi dans ce travail du coefficient d'extinction, ou, plus exactement, de son logarithme, ce qui permet d'utiliser pour le tracé des courbes une échelle moins étendue. Cependant, pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux des autres auteurs, nous donnons aussi les résultats en coefficient d'extinction ( $\varepsilon$ ) [densités optiques ( $\delta$ ) pour une épaisseur de 1 centimètre] et en coefficients d'absorption (K).

## 2° TRAVAUX ANTÉRIEURS.

Dhéré [2], en 1909, fut le premier croyons-nous qui étudia le spectre d'absorption du sérum dans l'ultra-violet. Ensuite ce furent M<sup>me</sup> V. Henri, V. Henri et R. Wurmser [3] qui montrèrent, sur le sérum de cobaye, en 1912, que « l'absorption est faible jusqu'à 3.000 Å, puis augmente, passe par un maximum qui correspond à la bande d'absorption de l'albumine pour  $\lambda = 2.880$  Å, puis diminue, passe par un minimum pour  $\lambda = 2.503$  Å et augmente de plus en plus rapidement de sorte que, pour l'ultra-violet extrême, le coefficient d'extinction dépasse 1.000. L'allure de la courbe est

exactement la même pour le sérum de lapin ». Les auteurs trouvent pour le maximum d'absorption du sérum (sans spécifier à quel animal il appartient) un coefficient d'extinction égal à 69 et pour le minimum une valeur de 42.

S. Judd Lewis [4], en 1916, a étudié aussi l'absorption du sérum pour les rayons ultra-violet. Par la méthode du secteur tournant il trouve, dans le proche ultra-violet, une faible absorption qui monte rapidement à partir de 3.000 Å pour arriver à son maximum à 2.800 Å. Elle descend à son minimum que l'auteur fixe à 2.540 Å environ pour remonter à pic jusqu'à 2.400 Å. L'auteur ajoute qu'il a trouvé une autre partie descendante de la courbe vers 2.300 Å dans trois ou quatre sérums pathologiques (sans spécification du cas pathologique). C'est le seul auteur qui ait signalé ce fait. Il montre aussi que les sérums normaux humains qu'il a étudiés donnaient tous sensiblement la même courbe, indépendamment de l'âge et du sexe. La bande centrale lui apparaît légèrement plus étroite chez les femmes et un peu plus basse chez les enfants, mais il lui est difficile de se prononcer, même dans les expériences faites dans les meilleures conditions.

Cet auteur prouve, par extraction et spectrophotométrie des protéides, que la bande centrale qui commence vers 3.000 Å pour finir vers 2.400 Å, est due uniquement aux protéides sériques (constatation déjà faite par V. Henri). Le sérum de cheval lui a donné les mêmes résultats : maximum à 2.800 Å et minimum à 2.510 Å avec une amplitude un peu plus grande pour le maximum, ce qui fait que la bande due aux protéides paraît un peu moins large qu'avec le sérum humain. Judd Lewis étudie aussi des sérums pathologiques ; dans la typhoïde, il trouve un léger décalage du minimum : de 2.540 Å à 2.510 Å ; dans la scarlatine, la bande centrale d'absorption est plus étroite ; dans la tuberculose, il remarque une légère augmentation du coefficient d'extinction dans le proche ultra-violet et enfin aucune variation dans l'anémie pernicieuse.

En 1920, T. Tadokoro [5], puis T. Tadokoro et Y. Nakayama [6] étudient le sérum normal et les immuns-sérums (anti-lait, anti-albumine d'œuf, anti-rat, anti-streptocoques). Leurs sérums sont dilués dans l'eau physiologique. Ils trouvent



une différence dans la largeur de la bande d'absorption (comprise entre 2.800 Å et 2.810 Å) pour les sérums des différents animaux (Chien, Cobaye, Lapin, Cheval) et observent que cette même bande est plus large et plus longue (?) avec les immuns-sérums. Mais ces travaux ne peuvent être pris en considération car les auteurs ont uniquement fait des déterminations de longueurs d'onde sans préciser les densités optiques ou les coefficients d'absorption ou d'extinction. Leurs travaux ont uniquement un but quantitatif et on sait depuis que différents échantillons de sérums normaux donnent des valeurs différentes pour la position du maximum et du minimum, sans parler des erreurs expérimentales faites dans la détermination des  $\lambda$ .

Ce n'est qu'en 1922 que la question fut reprise sérieusement par S. Judd Lewis [7] dans un important travail où l'auteur étudie le pouvoir rotatoire des protéides sériques et l'absorption des rayons ultra-violet par le sérum. Pour cette dernière partie de son travail il emploie un nouveau secteur tournant photométrique décrit dans un travail précédent [8]. De plus, il isole par précipitation au sulfate d'ammonium les différentes fractions protéidiques du sérum : euglobulines, pseudo-globulines et albumines. Les positions respectives du maximum et du minimum de ces fractions sont à très peu près celles du sérum. L'auteur donne aussi les coefficients d'extinction des maxima et des minima pour des solutions de ces fractions dans l'eau physiologique.

Plusieurs auteurs se sont attaqués au problème de l'absorption des acides aminés et de leur rapport avec l'absorption du sérum. Citons P. A. Kober [9], F. W. Ward [10], L. Marchlewski [11], Abderhalden et Haas [12], W. Stenström et M. Reinhard [13], C. S. Hicks [14], S. Judd Lewis [15]. Les résultats de ces auteurs sont semblables et plusieurs montrent qu'en mélangeant dans certaines proportions la tyrosine, le tryptophane, la phénylalanine, la cystine, la leucine, le glycocolle et l'acide glutamique, on arrive à reproduire à très peu près le spectre d'absorption du sérum.

F. C. Smith [15], en 1929, étudie l'absorption des rayons ultra-violet par les différentes fractions sériques isolées par la méthode de L. F. Hewitt [16]. Il trouve quelques différences

avec les résultats énoncés en 1922 par Judd Lewis, ce qui s'explique facilement, les fractions sériques ayant été isolées par des méthodes différentes par ces deux auteurs.

En 1932, L. Karczag et M. Hanák [17] montrent que l'âge, le sexe, le groupe sanguin et différents états pathologiques sont sans influence sur la courbe d'absorption du sérum, de même que le chauffage à 56° pendant une heure ; l'action du formol à une concentration égale à 20 p. 100 ou du formol et de la soude simultanément, l'action des rayons X ne l'altèrent pas sensiblement. Les rapports quantitatifs entre les différentes fractions protéidiques du sérum n'influent pas sur la valeur de l'absorption. Les auteurs vérifient aussi que la courbe d'absorption du sérum peut être considérée comme la somme des absorptions partielles des différentes fractions.

Mladen Paic [18], en 1934, trouve le spectre du sérum normal identique à celui du sérum de syphilitique. Pour cela il opère avec des sérums dilués au tiers dans l'eau physiologique. En collaboration avec P. Haber [19], il remarque que l'irradiation préalable du sérum par les rayons ultra-violets en augmente la densité optique.

Enfin, dernièrement, M<sup>me</sup> et P. Lecomte du Noüy [20, 21], dans une série de très belles recherches sur la température critique du sérum, ont prouvé, en employant une technique extrêmement précise, que la courbe d'absorption du sérum est remarquablement stable dans l'ultra-violet et qu'elle ne varie pas avec l'âge et les différents états pathologiques. Contrairement aux résultats énoncés par L. Karczag et M. Hanák, ils ont montré que le chauffage pendant une heure à des températures s'échelonnant entre 56° et 60° fait varier légèrement dans les deux sens la densité optique du maximum et du minimum et fait osciller la longueur d'onde de ces points autour de leurs positions normales.

Dans deux cas seulement, l'un de strongylose chez une brebis (P. Lecomte du Noüy et M. Aynaud [22]), l'autre de paraplégie flasque par compression médullaire due à un cancer secondaire de la colonne vertébrale (P. Lecomte du Noüy et M<sup>me</sup> Lecomte du Noüy [23]), les auteurs ont trouvé une courbe d'absorption qui paraissait normale, mais qui se déforma complètement après chauffage du sérum pendant une

heure à 60°. Dans ces deux cas le sérum était incoagulable par la chaleur.

Ces auteurs ont aussi montré [24] qu'on pouvait, en calculant la différence de densité optique entre le maximum et le minimum d'un sérum, faire une classification naturelle des espèces vivantes : cette différence est la plus élevée chez les mammifères, moindre chez les oiseaux, encore plus faible pour les amphibiens et la plus basse chez les reptiles.

Comme on le voit, les travaux concernant l'absorption du sérum dans l'ultra-violet ont été nombreux jusqu'à maintenant. Cependant il nous a paru intéressant devant la confusion qui règne encore à divers points de vue, d'élucider certaines questions. Notamment nous nous sommes demandé si réellement le rapport des différentes fractions protéidiques du sérum influe sur la courbe d'absorption de celui-ci. Or, dans certains cas pathologiques, on trouve une modification de ce rapport, en particulier dans le paludisme et surtout dans le kala-azar.

A vrai dire, N. D. Kehar [25], en 1932, aux Indes, en étudiant des sérums normaux et des sérums paludéens, a trouvé que ces derniers sérums présentaient en général une absorption plus grande que les sérums normaux tout en possédant les mêmes longueurs d'onde au maximum et au minimum. Mais ce travail ne peut guère être pris en considération. En effet, d'une part l'auteur ne se livre pas à des mesures quantitatives ; il se contente de photographier, *l'un après l'autre*, sous la même épaisseur dans un tube de Baly et sur la même plaque, le spectre d'un sérum normal et le spectre d'un sérum paludéen dilués au même titre dans l'eau physiologique. La source est un arc au fer dont l'intensité peut varier d'un spectre à l'autre, ce qui fait que les noircissements observés ne peuvent être comparés. D'autre part, les sérums paludéens sont pris pour la plupart au moment de l'accès palustre, et on sait qu'à cette période il y a présence dans le sang de déchets globulaires qui peuvent fausser les résultats.

Dans un travail paru aussi aux Indes, en 1932, T. C. Boyd et B. K. Bose [26] étudient, non pas le sérum paludéen, mais un sérum dont le déséquilibre protéidique est encore plus marqué : celui de sujets atteints de kala-azar. Les auteurs, se livrant à des mesures spectrophotométriques, trouvent que



le sérum de ces malades, dilué à 1 p. 5 dans l'eau physiologique, présente un coefficient d'extinction plus élevé que celui du sérum normal (sérum normal, coefficient au maximum = 0,85, au minimum = 0,45 ; sérum pathologique : au maximum = 1,10, au minimum = 0,50). Ils attribuent ce fait soit à un changement dans la composition chimique des protéides sériques, soit à une variation dans le rapport des fractions protéidiques. Malheureusement, les auteurs ne donnent aucune indication permettant de mesurer la grandeur de ce déséquilibre sérique, pas plus qu'ils ne définissent l'état des malades dont le sérum a été étudié.

Ici, ouvrons une parenthèse : Chorine [27] a montré que le sérum de la poule présente un rapport euglobulines/protéides totaux supérieur à celui de l'homme normal et que le sérum des paludéens possède la même anomalie. Le sérum de la poule se rapproche donc à ce point de vue du sérum paludéen. Le sérum de poule dilué au 1/10 dans l'eau distillée floccule à l'instar des sérums paludéens. Or Lecomte du Noüy [24] trouve que dans le sérum des oiseaux la différence de densité optique entre le maximum et le minimum est plus faible que chez les mammifères. On pourrait s'attendre à trouver pour le sérum paludéen, et à plus forte raison pour le sérum de kala-azar (qui parmi les sérums pathologiques a le rapport euglobulines/protéides totaux le plus élevé) une différence de densités optiques plus faible que pour le sérum normal. Or, si nous considérons le travail de Boyd et Bose [26], nous voyons que ces auteurs trouvent le contraire :  $0,85 - 0,45 = 0,30$  pour le sérum normal et  $1,10 - 0,50 = 0,60$  pour le sérum des sujets atteints de kala-azar.

Avant d'exposer les résultats de nos recherches, nous allons indiquer brièvement la technique spectrographique choisie et les conditions dans lesquelles nous avons prélevé les sérums et fractionné les protéides sériques.

### 3° TECHNIQUE SPECTROGRAPHIQUE.

Le spectrographe utilisé est le grand spectrographe pour chimistes de Zeiss à optique de quartz. Les plaques photogra-

phiques (format  $13 \times 18$  centimètres), très sensibles dans tout l'ultra-violet jusqu'à  $2.400 \text{ \AA}$  sont de la marque Super-Fulgur (Maison Guilleminot). La source de rayons ultra-violet est une lampe à hydrogène système Chalonge alimentée par un transformateur sous une tension de 2.000 volts. L'intensité du courant qui traverse le tube a toujours été réglée à 250 milliampères. On obtient ainsi un spectre continu depuis le visible jusqu'à  $2.400 \text{ \AA}$  environ. Une lentille de quartz placée devant la source donne un faisceau de rayons de lumière parallèle qui tombe sur la fente du spectrographe. Celle-ci a une largeur de 0 millim. 40.

Pour pouvoir faire des mesures photométriques, l'appareil comporte devant la fente un prisme de Hübner muni d'un support qui sert à maintenir dans le faisceau lumineux la cuve contenant la solution étudiée et la cuve contenant le solvant pur. Ce prisme ramène les deux faisceaux ayant traversé respectivement les deux cuves l'un au-dessus de l'autre sur la fente du spectrographe. Ce qui fait qu'en définitive on obtient sur la plaque photographique deux spectres qui se touchent sans empiéter l'un sur l'autre. Chacun d'eux correspond à une cuve. On n'a pas à craindre, grâce à ce système, les différences de noircissement dues aux variations d'intensité de la lumière émise par la lampe à hydrogène (quoique le rayonnement de celle-ci soit très stable).

Ici on considère le sérum comme solution et l'eau physiologique ou l'eau bidistillée comme solvant.

L'intensité du flux lumineux qui traverse le solvant peut être affaiblie dans un rapport connu par un secteur tournant double de Gude. En vérité, ce n'est pas l'intensité lumineuse qui est réduite par le secteur tournant, mais le temps de pose apparent. A condition que l'appareil fasse un assez grand nombre de tours à la minute (120 tours/minute), le temps de pose efficace est égal au produit du temps de pose apparent par  $\frac{\alpha}{2\pi}$  ( $\alpha$  étant l'angle d'ouverture du secteur). Or, diminuer le temps de pose revient au même, au point de vue noircissement de la plaque photographique, que diminuer le flux lumineux (loi de réciprocité). Si l'on admet cette loi, on voit que l'emploi du secteur tournant revient à diminuer,

dans des proportions faciles à déterminer, l'intensité lumineuse passant dans le solvant.

Certains auteurs font un reproche à cette méthode : le noircissement obtenu, disent-ils, par dix poses successives d'une seconde par exemple, n'est pas égal au noircissement obtenu avec une seule pose de dix secondes. Ce reproche, qui est peut-être bien fondé, n'est pas valable dans notre technique : en effet, par l'emploi du secteur double, la lumière qui traverse la solution étudiée est interrompue le même nombre de fois à la seconde que celle qui traverse le solvant.

Lorsque, sur la plaque photographique, pour une longueur d'onde déterminée il y a égalité de noircissement pour la photographie du solvant et de la solution, pris sous la même épaisseur et photographiés en même temps, le rapport  $\frac{I_0}{I}$  est égal au rapport  $\frac{2\pi}{\alpha}$  ( $\alpha$  étant l'angle d'ouverture du secteur tournant. Le secteur dont nous nous servons est directement gradué suivant le pourcentage de lumière qui tombe sur la cuve contenant le solvant. Le rapport  $\frac{I_0}{I}$  est alors égal à

$$\frac{100}{\text{chiffre indiqué sur le secteur}}.$$

Nous avons mesuré le coefficient d'extinction  $\epsilon$  défini par :

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon d}$$

d'où l'on tire :

$$\epsilon = \frac{1}{d} \cdot \log_{(10)} \frac{I_0}{I}.$$

Pour cette mesure nous avons gardé un temps de pose constant à une minute et nous avons fait varier l'épaisseur de la tranche de sérum et celle du liquide considéré comme solvant. Le secteur tournant était réglé de façon que le flux passant dans le solvant soit égal à 10 p. 100 ou à 25 p. 100 du flux traversant le sérum ( $\frac{I_0}{I} = 10$  dans le premier cas et  $\frac{I_0}{I} = 4$  dans le second cas). Le sérum et le liquide considéré



comme solvant étaient donc photographiés en même temps et sous la même épaisseur, pendant le même temps.

Pour pouvoir opérer avec des sérums non dilués, il faut en prendre une tranche peu épaisse pour obtenir la photographie de la région intéressante de la courbe d'absorption qui est comprise entre 3.000 Å et 2.400 Å. Or, avec l'énergie lumineuse que nous employons, sous l'épaisseur de 1 millimètre le sérum ne laisse passer que les radiations de  $\lambda$  supérieures à 3.000 Å. C'est pourquoi nous nous sommes servi de cuves à faces de quartz construites spécialement par la maison Jobin et Yvon. Ces cuves à épaisseur variable permettent de réaliser des épaisseurs comprises entre 2 centimètres et 0 millim. 01 par bonds de 0 millim. 01.

Nous avons fait par cette méthode environ 1.500 spectres de sérums normaux et de sérums paludéens.

Les clichés ont été étudiés au microscope comparateur ; chaque cliché porte une échelle de longueur d'onde que l'on photographie après l'enregistrement des spectres. Nous avons vérifié cette échelle pour chaque cliché en photographiant en dessous le spectre d'un arc à vapeur de mercure.

Nous avons tracé les courbes d'absorption des sérums en portant en ordonnées les longueurs d'onde et les fréquences et en abscisses les logarithmes vulgaires des coefficients d'extinction. Nous avons donné aussi pour chaque sérum, en fonction de  $\lambda$  les valeurs de  $\epsilon$ , soit, comme on l'a vu précédemment, la densité optique pour une épaisseur de 1 centimètre. Nous avons calculé aussi pour chaque sérum de rapport

$$\frac{\text{coefficient d'extinction au maximum}}{\text{coefficient d'extinction au minimum}}$$

*Erreurs.* — L'erreur la plus grande qui soit commise dans l'interprétation des spectres est certainement celle que l'on fait en déterminant la position des égalités de noircissement par rapport aux longueurs d'onde. Cette position ne peut être déterminée au microscope comparateur qu'avec une approximation de  $\pm 5$  Å dans les cas les meilleurs. L'erreur de détermination dans la valeur du coefficient d'extinction ne peut provenir que de l'erreur faite sur la lecture de l'épaisseur du sérum, car l'erreur sur  $\frac{I_0}{I}$  peut être regardée pratiquement

comme nulle puisque c'est par réglage du secteur tournant que l'on fixe cette valeur. Or, l'erreur sur l'épaisseur est faible étant donné que les cuves utilisées sont divisées au 1/100 de millimètre. A condition d'être sûr de la bonne fabrication de la cuve, on peut évaluer cette erreur à  $\pm 0$  millim. 005 au maximum.

#### 4° PRÉLÈVEMENTS ET ANALYSE DES SÉRUMS.

Les sérums paludéens que nous avons étudiés provenaient soit du service de M. le Dr Guiraud (1) [Médecin-Chef de Service à l'Asile clinique de Sainte-Anne] et appartenant à des paralytiques généraux impaludés avec une souche de *Plasmodium vivax*, soit de paludéens revenant des colonies et prélevés dans le service de M. le professeur Marchoux, à l'Institut Pasteur (Service des Maladies coloniales). Les sérums normaux ont été choisis aussi dans ces deux services. Un examen préliminaire nous a permis de nous assurer que le sérum des paralytiques généraux était identique du point de vue spectrographique au sérum normal et qu'on pouvait de ce point de vue le considérer comme tel.

Les malades et les sujets normaux étaient à jeun depuis douze heures quand on prélevait leur sang (ponction veineuse au bras). Le sérum était séparé du caillot vingt-quatre heures après, sauf dans deux ou trois cas étudiés spécialement. On le centrifugeait pour avoir un liquide parfaitement limpide.

Pour chaque sérum, on dosait les protéides totaux et les euglobulines de la façon suivante :

1° *Protéides totaux*. — On précipite les protéides de 1 cent. cube de sérum par une quantité suffisante d'acide trichloracétique pour arriver à une concentration de 10 p. 100. On centrifuge et on lave le précipité par une solution à 10 p. 100 de ce même acide. Après avoir centrifugé à nouveau, on dissout le précipité dans un peu d'eau alcalinisée à la soude. On transvase la solution et l'eau de lavage du tube à centrifuger dans une petite fiole d'attaque pour le microdosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. Le catalyseur utilisé est celui qui est préconisé par le professeur G. Bertrand [28] (sulfate de potassium : 10 parties, sulfate de cuivre : 1 partie). L'ammoniaque formée après distillation

(1) Nous sommes heureux de remercier ici M. le Dr Guiraud qui nous a très aimablement accueilli dans son service.

dans l'appareil de Meillière et de Saint-Rat [29] est dosée avec de l'acide sulfurique N/10 (indicateur : rouge de méthyle + bleu de méthylène).

2° *Euglobulines*. — On précipite les euglobulines de 2 cent. cubes de sérum par dialyse contre l'eau distillée dans de petits sacs en collodion. L'opération a lieu à la glacière et dure cinq jours pendant lesquels on renouvelle l'eau chaque jour. Le précipité est repris avec précautions et on dose l'azote par la microméthode de Kjeldahl. Le coefficient de passage du poids d'azote trouvé au poids des euglobulines est pris égal à 6,4. Nous avons suivi pour ces dosages la technique préconisée par Chorine [30] dans ses recherches sur l'instabilité du sérum dans l'eau distillée.

On peut se demander pourquoi nous avons cherché pour chaque sérum la teneur en euglobulines et en protéides totaux. La raison en est que le rapport euglobulines/protéides totaux permet de séparer les sérums normaux des sérums paludéens. En effet, Chorine [30] a montré que ce rapport est plus élevé avec ces derniers sérums qu'avec les sérums normaux. De plus, par dilution au 1/10 dans l'eau distillée, il distingue par leur floculation les sérums paludéens des sérums normaux : les premiers floculent, les seconds ne floculent pas. En prenant ce fait pour base, cet auteur [31] a mis au point une réaction mesurable au photomètre, réaction qui sert à discriminer les sérums normaux des sérums paludéens et qui, de plus, donne une idée du déséquilibre sérique de ces malades. Dans une remarquable série de travaux [32, 33], Chorine a montré que l'intensité de cette réaction est proportionnelle au rapport euglobulines/protéides totaux et que cette propriété de floculer qu'ont les sérums paludéens ou ceux des malades atteints de kala-azar, est due surtout à l'augmentation quantitative des euglobulines par rapport aux autres protéides sériques.

Nous avons pratiqué cette réaction pour chaque sérum étudié.

### 3° SPECTRES D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET DES SÉRUMS NORMAUX ET DES SÉRUMS PALUDÉENS.

A. SÉRUMS NORMAUX. — Nous avons retrouvé les résultats classiques. Examinons la figure n° 1, où nous avons divisé la courbe en plusieurs parties :



*Portion  $\alpha$ .* — A la fin du visible, on observe avec presque tous les sérums un maximum plus ou moins prononcé que l'on peut fixer vers  $4.100 \text{ \AA}$ . Il est dû à la couleur du sérum

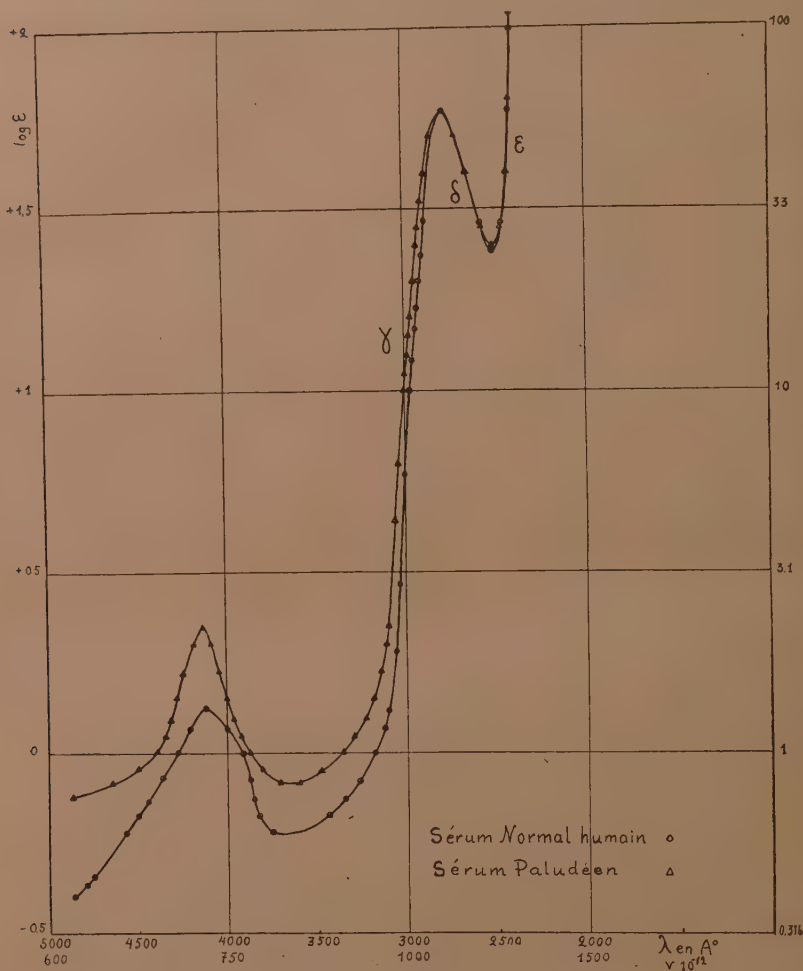


FIG. 4. — La portion  $\alpha$  s'étend de  $5.000 \text{ \AA}$  à  $4.000 \text{ \AA}$   
et la portion  $\beta$  de  $4.000 \text{ \AA}$  à  $3.000 \text{ \AA}$ .

et on peut l'attribuer aux pigments biliaires qui existent dans le sang. Le coefficient d'extinction ( $\epsilon$ ) de ce maximum varie avec la teneur du sang en ces sels. Il est compris

entre 1 et 10 ( $0 < \log. \epsilon < + 1$ ). En général, il oscille entre 2,5 et 4 ( $0,4 < \log. \epsilon < 0,6$ ).

*Portion  $\beta$ .* — Cette partie de la courbe ne présente rien de remarquable. Son coefficient d'extinction est faible jusqu'à 3.200 Å environ. Elle présente un minimum aux environs de 3.700 Å ( $0,5 < \epsilon < 2$ ). A partir de 3.200 Å la courbe monte rapidement.

Avec les sérums hémolysés, au lieu de montrer un seul minimum, cette portion de la courbe présente deux minimas. Le premier est situé vers 3.800 Å, le second vers 3.200 Å. Entre ces deux points, il existe un maximum vers 3.400 Å. Cette courbe en  $\sim$  est plus ou moins marquée suivant l'état d'hémolyse du sérum. Cet état d'ailleurs n'influe pas sur la partie de la courbe située plus loin dans l'ultra-violet, comme nous l'avons vu pour de nombreux sérums.

*Portion  $\gamma$ .* — Elle commence à 3.000 Å pour monter à pic jusqu'à son maximum situé vers 2.800 Å. Suivant les sérums ce maximum se trouve placé entre 2.760 Å et 2.800 Å. La moyenne trouvée dans nos expériences est de 2.775 Å + — 10 Å, ce qui s'accorde avec les résultats énoncés par tous les auteurs. Le coefficient d'extinction de ce maximum est compris entre 56 et 66 (moyenne 59,7).  $\log. \epsilon$  est compris entre 1,77 et 1,8. M<sup>me</sup> V. Henri, V. Henri et R. Wurmser [3] indiquent pour  $\epsilon$  la valeur 69. Les autres auteurs, opérant sur des sérums dilués, obtiennent des résultats qui ne peuvent être comparés avec les nôtres, ni même être calculés en fonction de la dilution puisqu'on sait que le sérum n'obéit pas à la loi de Beer.

L'épaisseur qui correspond dans nos expériences à la transparence du sérum pour ces longueurs d'onde est de 1 millimètre ( $\lambda = 3.000 \text{ Å}$ ) jusqu'à 0 millim. 6 ( $\lambda = 2.800 \text{ Å}$ ).

*Portion  $\delta$ .* — La courbe redescend jusqu'à son minimum vers 2.517 Å + — 10 Å (moyenne de nos expériences où les valeurs oscillent entre 2.510 Å et 2.530 Å). Le coefficient  $\epsilon$  de ce minimum est égal à 25,6 (valeur moyenne, les valeurs extrêmes étant 24 et 31).  $\log. \epsilon$  est compris entre 1,38 et 1,50.

*Portion  $\epsilon$ .* — La courbe remonte encore une fois à pic vers 2.400 Å pour un coefficient d'extinction égal à 100 ( $\log. \epsilon = 2$ ).

L'épaisseur qui correspond à cette transparence est très faible : 0 millim. 45.

Il est vraiment remarquable de constater la stabilité de la courbe d'absorption du sérum à partir de 3.000 Å, partie où l'absorption est due aux protéides sériques. On trouve, comme on l'a vu, de faibles variations des  $\lambda$  du maximum et du minimum ainsi que de faibles variations du coefficient d'extinction de ces deux points (indépendamment des erreurs expérimentales).

Nous avons calculé pour chaque sérum le rapport

$$\frac{\text{au maximum } (\epsilon_M)}{\text{au minimum } (\epsilon_m)}.$$

La moyenne de ce rapport pour les sérums normaux est de 2,3.

Nous avons voulu savoir si le sérum décanté aussitôt après son exsudation du caillot présente le même spectre d'absorption que le sérum prélevé vingt-quatre heures après la prise de sang. Sur le même échantillon, nous avons séparé une partie du sérum quatre heures après la coagulation, et le reste au bout de vingt-quatre heures. Sur 3 échantillons différents de sang les résultats furent exactement les mêmes : que le sérum soit prélevé quatre ou vingt-quatre heures après la coagulation les spectres d'absorption sont identiques (voir tableau I).

Voici un tableau donnant les résultats de quelques sérums normaux (Tableau I).

Nous voyons à l'examen de ce tableau que les différences de teneur des sérums en protéides ou de faibles variations du rapport euglobulines/protéides totaux n'influent pas sur les valeurs du coefficient d'extinction. D'ailleurs ces résultats ne doivent pas nous surprendre si l'on songe à la forte opacité des protéides pour les rayons ultra-violets. Une faible variation de la concentration des protéides dans le sérum (par exemple de 75 à 80 grammes par litre) entraîne une si faible variation de la valeur de  $\epsilon$  qu'il est difficile de la mettre en évidence et que cette différence est de l'ordre des erreurs expérimentales. Il faut remarquer de plus que, dans nos expériences, les variations de  $\epsilon$  ne se font pas toujours dans le même sens que les variations de la concentration en protéides.



TABLEAU I.

NOM DU SUJET	RÉACTION à l'eau distillée	PROTÉIDES TOTAUX en grammes par litre	EUGLOBULINES/PROTÉIDES TOTAUX	LONGUEUR d'onde		COEFFICIENT d'absorption		COEFFICIENT d'extinction		LOG. (10) du coefficient d'extinction		$\epsilon_{\text{m}}/\text{cm}$	OBSERVATIONS
				du maximum	du minimum	du maximum	du minimum	du maximum	du minimum	du maximum	du minimum		
Bé...	2	76,9	27,7	2.760 Å	2.515 Å	438	55,2	60	24	4,77	4,38	2,50	Sérum prélevé 4 heures après la prise de sang.
Bé...	7	74,9	28,3	2.760 Å	2.515 Å	438	55,2	60	24	4,77	4,38	2,50	Prélevé 24 heures après la prise de sang.
Boc...	42	80,0	28,5	2.775 Å	2.530 Å	429,8	55,2	56,6	24	4,75	4,38	2,35	
X...	2	76,4	30,2	2.775 Å	2.510 Å	451,8	59,8	66	26	4,80	4,42	2,53	
Gr...	46	75,9	30,4	2.780 Å	2.515 Å	445	57,5	50	25	4,69	4,40	2,00	
Y...	40	73,5	28,5	2.800 Å	2.520 Å	451,8	71,3	66	34	4,80	4,50	2,42	Délire aigu.

B. SÉRUMS PALUDÉENS. — Les nombreux sérums paludéens que nous avons examinés nous ont donné les mêmes résultats que les sérums normaux. On peut énoncer les mêmes remarques que précédemment pour les différentes portions de la courbe d'un sérum paludéen (fig. 1). Voici quelques chiffres (tableau II).

Les différences observées entre un sérum normal et un sérum paludéen sont du même ordre de grandeur que ce soit dans la position ou le coefficient d'extinction du maximum et du minimum, que celles observées entre des sérums normaux ou entre des sérums paludéens. La moyenne du coefficient d'extinction au maximum est de 55,5 et de 24,8 pour le minimum. La moyenne du rapport  $\varepsilon_u/\varepsilon_m$  est égale à 2,23.

On voit que de fortes variations du rapport euglobulines/protéides totaux n'agissent pas sur l'absorption. Ceci laisse donc supposer que les différentes fractions protéidiques du sérum ont un pouvoir d'absorption voisin et que les différences de  $\varepsilon$  qui existent entre chaque fraction sont relativement faibles par rapport à ce coefficient.

Comme pour le sérum normal, nous avons vu aussi que le sérum paludéen prélevé quatre heures ou vingt-quatre heures après la coagulation du sang présentait le même spectre d'absorption.

Nous avons voulu savoir si, juste avant, pendant et aussitôt après l'accès, on ne pouvait pas déceler une variation dans la courbe d'absorption du sérum. Pour cela, on a fait, sur le même malade, des prélèvements de sang à ces trois moments différents. Le malade avait une température de 40°2 quand la prise de sang fut faite pendant l'accès. Les deux autres prélèvements ont été faits à 37° (avant l'accès) et à 37°3 (après l'accès). Aucune différence dans la bande caractéristique d'absorption n'a pu être mise en évidence (voir le tableau II).

De même au cours des visites que nous avons faites à Sainte-Anne, nous avons eu l'occasion de recueillir le sang d'une malade atteinte de délire aigu. Le spectre de son sérum fut trouvé identique à celui du sérum normal.

Voici deux exemples de construction de la courbe d'absorption d'un sérum. L'un concerne un sérum normal non hémolysé, l'autre un sérum paludéen hémolysé.

TABLEAU II.

NOM DU MALADE	RÉACTION à l'eau distillée	PROTIDES TOTAUX en grammes par litre	EUGLOBULINES/PROTIDES TOTALUX	LONGUEUR d'onde		COEFFICIENT d'absorption		COEFFICIENT d'extinction		LOG.(10) du coefficient d'extinction		$\epsilon \text{ M/cm}$	OBSERVATIONS
				du maximum	du minimum	du maximum	du minimum	du maximum	du minimum	du maximum	du minimum		
Dev....	7	75,2	28,7	2.760 Å	2.515 Å	138	55,2	60	24	1,77	1,38	2,50	4 heures après la prise de sang.
Dev....	17	80,2	33,2	2.780 Å	2.520 Å	138	55,2	60	24	1,77	1,38	2,50	24 heures après la prise de sang (3° accès).
Tass....	9	78,3	29,5	2.765 Å	2.510 Å	91,7	43,7	39,9	19	1,60	1,30	2,10	Entre le 3° et le 4° accès.
Arn....	66	75,7	39,3	2.780 Å	2.530 Å	115	57,5	50	25	1,69	1,40	2,00	Paludéen revenant des colonies.
Dev....	22	73,1	33,1	2.780 Å	2.510 Å	129,8	57,5	56,6	25	1,75	1,40	2,26	Après le 7° accès.
Tass....	24	77,3	34,2	2.780 Å	2.520 Å	129,8	55,2	56,6	24	1,75	1,38	2,35	Après le 8° accès.
Dev....	38	79,5	37,9	2.800 Å	2.525 Å	115	65,5	60	28,5	1,77	1,45	2,40	Après le 8° accès, hémolysé.
Berth....	25	76,9	33,9	2.780 Å	2.495 Å	151,8	65,5	66	28,5	1,82	1,45	2,31	Juste avant le 3° accès, 37°.
Berth....	12	73,3	34,2	2.780 Å	2.500 Å	129,8	57,5	56,6	25	1,75	1,40	2,44	Pendant le 4° accès, 40°2.
Berth....	33	81,2	37,3	2.780 Å	2.515 Å	115	57,5	50	25	1,69	1,40	2,00	Juste après le 8° accès, 37°3.



*Premier exemple.* — Sérum de M<sup>lle</sup> B..., prélevé vingt-quatre heures après la prise de sang. Le sujet était à jeun depuis douze heures. Le sérum, centrifugé, était parfaitement clair.

Secteur tournant réglé à 25 p. 100 ( $\frac{I_0}{I} = 4. \text{Log. } \frac{I_0}{I} = 0,60$ )

ÉPAISSEUR du sérum en centimètres $d$	LONGUEURS D'ONDES des égalités de noircissement			COEFFICIENT d'extinction $\epsilon$	LOG. du coefficient d'extinction log. $\epsilon$
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$		
2,00. . . .		Pas d'égalités.			
1,90. . . .		Pas d'égalités.			
1,80. . . .		Pas d'égalités.			
1,70. . . .		Pas d'égalités.			
1,60. . . .		Pas d'égalités.			
1,50. . . .	4.850			0,39	— 0,40
1,40. . . .	4.780			0,42	— 0,36
1,30. . . .	4.740			0,45	— 0,34
1,20. . . .	4.660			0,49	— 0,30
1,10. . . .	4.640			0,54	— 0,26
1,00. . . .	4.610	3.760		0,60	— 0,22
0,90. . . .	4.580	3.830	3.520	0,66	— 0,17
0,80. . . .	4.500	3.850	3.350	0,72	— 0,13
0,70. . . .	4.340	3.870	3.260	0,84	— 0,07
0,60. . . .	4.220	3.900	3.180	0,96	0,00
0,50. . . .	4.200	4.020	3.130	1,20	+ 0,07
0,40. . . .		4.120	3.100	1,50	+ 0,14
0,30. . . .			3.075	1,98	+ 0,28
0,20. . . .			3.050	3,01	+ 0,46
0,10. . . .	3.000			6,02	+ 0,77
0,09. . . .	2.990			6,62	+ 0,82
0,08. . . .	2.985			7,22	+ 0,87
0,07. . . .	2.980			8,42	+ 0,93
0,06. . . .	2.970			9,99	+ 1,00
0,05. . . .	2.955			12,04	+ 1,08
0,04. . . .	2.945			15,05	+ 1,17
0,035. . . .	2.940			17,15	+ 1,23
0,030. . . .	2.910			20,04	+ 1,30
0,025. . . .	2.900	2.530		24,08	+ 1,38
0,020. . . .	2.890	2.565	2.475	30,10	+ 1,47
0,015. . . .	2.880	2.635	2.435	40,09	+ 1,60
0,010. . . .		2.790	2.415	60,20	+ 1,77
0,005. . . .			2.380	120,40	+ 2,08
0,001. . . .		Pas d'égalités.			

La figure 2 représente la courbe correspondant à ce sérum. Le calcul de  $\epsilon$  a été fait suivant la formule :  $\epsilon = \frac{1}{d} \cdot \text{Log. } I_0 = \frac{1}{d} \cdot 0,60$ .

*Deuxième exemple.* — Sérum de M<sup>me</sup> Berth..., prélevé vingt-quatre heures après la prise de sang. La malade était à jeun depuis vingt-quatre heures. Température : 37°. La malade est entre son troisième et son quatrième accès dû au *Plasmodium vivax*. Le sérum centrifugé est clair mais hémolysé.

Secteur tournant réglé à 10 p. 100 ( $\frac{I_0}{I} = 10. \text{Log. } \frac{I_0}{I} = 1$ ).

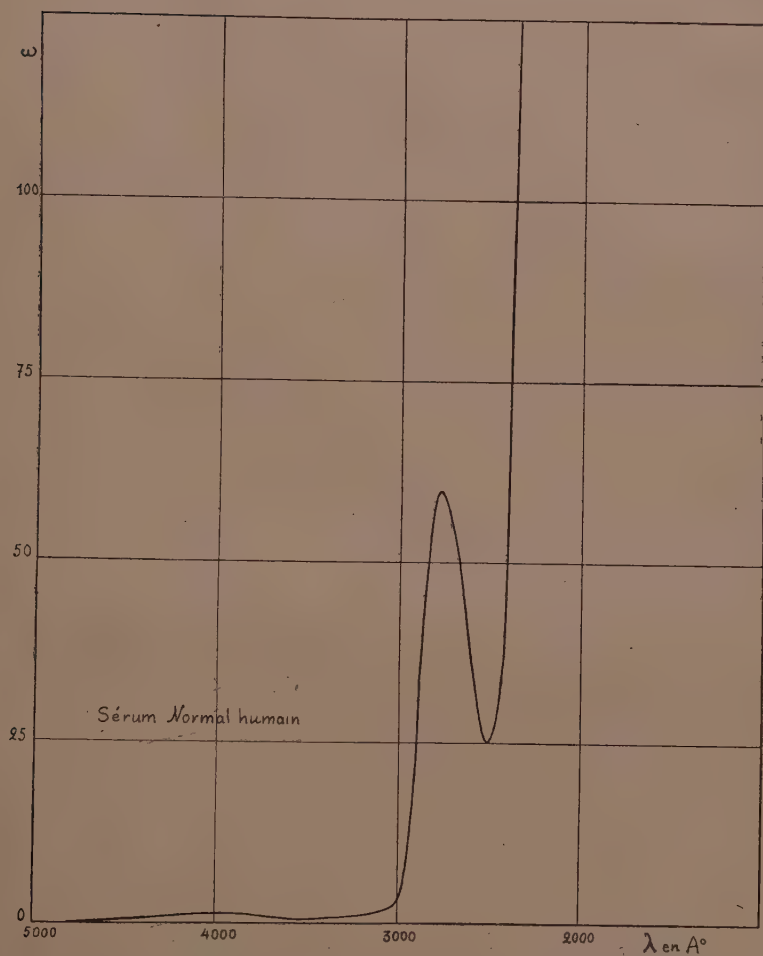


FIG. 2. — Spectre d'absorption d'un sérum normal. En ordonnées, les coefficients d'extinction en abscisses, les longueurs d'onde en  $\text{\AA}$ . Le sérum n'est pas hémolysé : un seul minimum vers 3.700  $\text{\AA}$ . Le maximum et le minimum dus aux protéides du sérum sont respectivement à 2.770  $\text{\AA}$  et à 2.530  $\text{\AA}$ .

ÉPAISSEUR du sérum en centimètres <i>d</i>	LONGUEURS D'ONDES des égalités de noircissement				COEFFICIENT d'extinction <i>ε</i>	LOG. du coefficient d'extinction log. <i>ε</i>
	<i>λ</i> <sub>1</sub>	<i>λ</i> <sub>2</sub>	<i>λ</i> <sub>3</sub>	<i>λ</i> <sub>4</sub>		
1,00 . . . .		Pas d'égalités.				
0,90 . . . .		Pas d'égalités.				
0,80 . . . .		Pas d'égalités.				
0,70 . . . .	4 860				1,42	+ 0,15
0,60 . . . .	4 720				1,66	+ 0,22
0,50 . . . .	4 630	3 675	3 200		2,00	+ 0,30
0,40 . . . .	4 580	3 800	3 650	3 300-3 150	2,50	+ 0,39
0,30 . . . .	4 380	3 850	3 430	3 090	3,33	+ 0,51
0,20 . . . .	4 215	3 950		3 050	5,00	+ 0,69
0,10 . . . .	4 180	4 080		3 000	10,00	+ 1,00
0,09 . . . .	4 150			2 990	11,11	+ 1,04
0,08 . . . .				2 980	12,50	+ 1,09
0,07 . . . .				2 970	14,28	+ 1,15
0,06 . . . .				2 960	16,66	+ 1,22
0,05 . . . .				2 950	20,00	+ 1,30
0,04 . . . .	2 930				25,00	+ 1,39
0,035 . . . .	2 920	2 495			28,57	+ 1,45
0,030 . . . .	2 900	2 580	2 465		33,33	+ 1,52
0,025 . . . .	2 880	2 625	2 450		40,00	+ 1,60
0,020 . . . .	2 860	2 690	2 435		50,00	+ 1,69
0,015 . . . .	2 780		2 415		66,66	+ 1,82
0,010 . . . .			2 390		100,00	+ 2,00
0 005 . . . .			2 345		200,00	+ 2,30
0,001 . . . .		Pas d'égalités.				

La figure 3 représente la courbe en fonction de  $\varepsilon$  correspondant à ce sérum. Le calcul de  $\varepsilon$  a été fait par la formule :

$$\varepsilon = \frac{1}{d} \cdot \text{Log.} \frac{I_0}{I} = \frac{1}{d} \cdot 1.$$

## 6° SPECTRES D'ABSORPTION

### DES DIFFÉRENTES FRACTIONS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM.

Nous avons, en partant du sérum de cheval normal, isolé les différentes fractions protéidiques de ce sérum. Nous en avons fait les spectres d'absorption en solution dans l'eau physiologique à la même concentration (1 p. 100) et à pH 7. Ensuite nous avons fait les spectres d'absorption de ces différentes fractions à la concentration à laquelle on les trouve dans le sérum, et nous avons vérifié que la somme des absorptions était égale à l'absorption du sérum entier.

#### a) PRÉPARATION DES FRACTIONS PROTÉIDIQUES DU SÉRUM DE



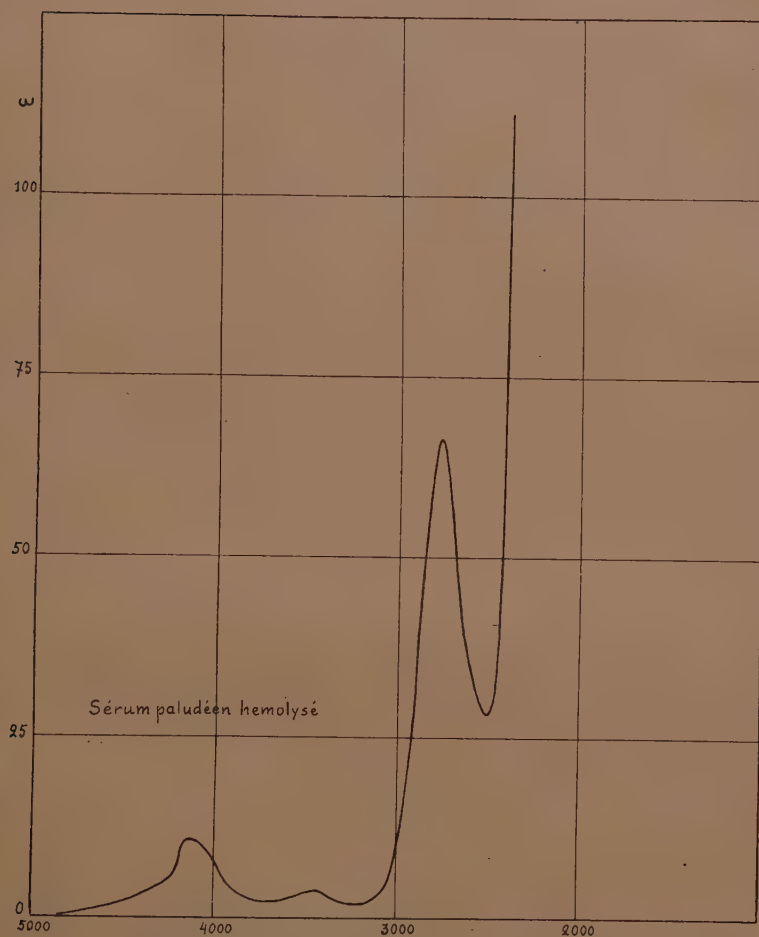


FIG. 3 — Spectre d'absorption d'un sérum paludéen. On voit nettement les deux minima (3.800  $\text{\AA}$  et 3.200  $\text{\AA}$ ) et le maximum 3.400  $\text{\AA}$  dus à l'hémolyse. Comme pour le sérum normal, le maximum et le minimum d'absorption des protéides sont respectivement à 2.780  $\text{\AA}$  et à 2.450  $\text{\AA}$ . Pour un sérum normal hémolysé, la courbe entre 4.000  $\text{\AA}$  et 3.000  $\text{\AA}$  serait identique.

CHEVAL. — Nous avons choisi la méthode d'Hofmeister [34] au sulfate d'ammonium.

250 cent. cubes de sérum de cheval normal sont additionnés d'une égale quantité d'une solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium. On abandonne à 37° pour une demi-heure. Il se forme un précipité, composé des globulines, que l'on sépare par centrifugation.

Le liquide surnageant, qui contient les albumines, est mis à dialyser dans un sac de collodion sous pression de quelques centimètres de mercure contre l'eau distillée. La dialyse est poursuivie pendant huit jours à la glacière, en ayant soin de changer l'eau distillée deux fois par jour. Le sulfate d'ammonium est ainsi éliminé et par augmentation de la pression on arrive à obtenir une solution concentrée d'albumines qui même précipitent lorsqu'elles sont arrivées à leur point isoélectrique. On peut les redissoudre en ajustant la valeur du pH à 7 par addition de soude faible. La concentration de la solution est déterminée par dosage d'azote sur 1 cent. cube de solution. Le coefficient de passage du poids d'azote trouvé à celui des albumines est pris égal à 6,25.

Le précipité qui est formé par les globulines est redissous dans 50 cent. cubes d'eau distillée. On les reprécipite par addition d'un volume égal de la solution saturée et neutre de sulfate d'ammonium. On abandonne encore une fois pour une demi-heure à 37° et on recueille le précipité par centrifugation. Ce précipité, dissous dans le minimum d'eau distillée, est mis à dialyser pendant huit jours à la glacière contre de l'eau distillée que l'on renouvelle deux fois par jour. Le sulfate d'ammonium est ainsi éliminé et les euglobulines insolubles dans l'eau distillée précipitent, cependant que les pseudo-globulines solubles restent en solution. On sépare alors par centrifugation les euglobulines que l'on débarrasse des traces de pseudo-globulines par plusieurs lavages à l'eau distillée. On les redissout par addition de chlorure de sodium et d'un peu de soude jusqu'à pH 7. Le titre de la solution est connu par dosage de l'azote contenu dans 1 cent. cube de solution (coefficient de passage = 6,40).

Les pseudo-globulines contenues dans le liquide surnageant sont ajustées à pH 7 et dosées comme les euglobulines (même coefficient de passage).

b) SPECTRES D'ABSORPTION DES EUGLOBULINES, DES PSEUDO-GLOBULINES ET DES ALBUMINES. — Nous avons photographié les spectres d'absorption de ces substances en solution à 1 p. 100 dans l'eau physiologique et à pH 7. Nos résultats concordent avec ceux énoncés par Judd Lewis [7]. L'examen de la figure 4 nous montre que :

Les trois fractions possèdent une courbe analogue à celle du sérum total, en ce qui concerne la position du maximum et du minimum d'absorption.

Le coefficient d'extinction du maximum est à peu près le

même pour les albumines et les pseudo-globulines. Celui des euglobulines est notablement plus élevé.

Le coefficient d'extinction au minimum est de beaucoup le plus bas pour les pseudo-globulines, alors qu'il est à peu près le même pour les deux autres fractions.

La différence d'amplitude entre le maximum et le minimum est la plus grande pour les pseudo-globulines et la plus faible pour les albumines.

On voit, par tous les caractères ci-dessus énoncés, que les euglobulines se rapprochent des pseudo-globulines alors que

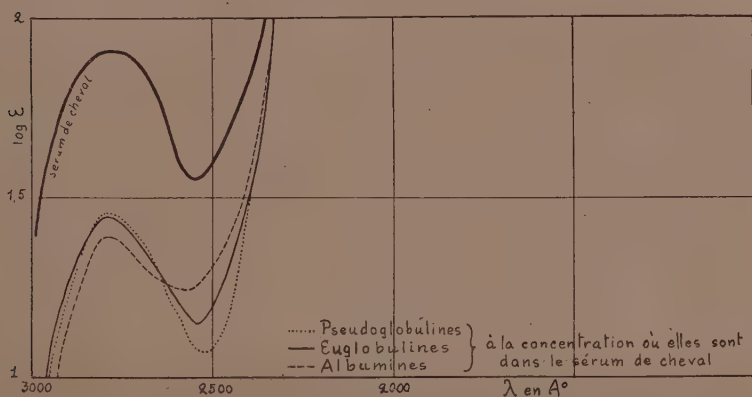


FIG. 4.

les albumines s'en éloignent nettement, ce qui n'implique pas forcément, comme le pense H. Chick [35], que les deux globulines ne sont qu'une modification l'une de l'autre.

c) SPECTRES D'ABSORPTION DES FRACTIONS PROTÉIDIQUES A LA CONCENTRATION OÙ ELLES SONT DANS LE SÉRUM. — Nous avons fait le dosage des trois fractions protéidiques sur le sérum de cheval d'où elles provenaient. Nous avons trouvé :

Protéides totaux . . . . .	75 gr. 25 par litre.
Globulines totales . . . . .	46 gr. 14 —
Euglobulines . . . . .	20 gr. 60 —
Pseudoglobulines. . . . .	25 gr. 08 —
Albumines . . . . .	29 gr. 70 —

Ensuite, nous avons préparé des solutions de ces trois frac-



tions dans l'eau physiologique à pH 8,2 (pH du sérum utilisé) à des concentrations qui sont respectivement celles trouvées dans l'analyse du sérum. La figure 5 représente ces résultats. On y voit aussi la courbe d'absorption du sérum entier d'où ont été isolées les fractions utilisées. On peut remarquer :

Que le coefficient d'extinction au maximum pour le sérum est égal à 80 et qu'il est à très peu près égal à la somme des

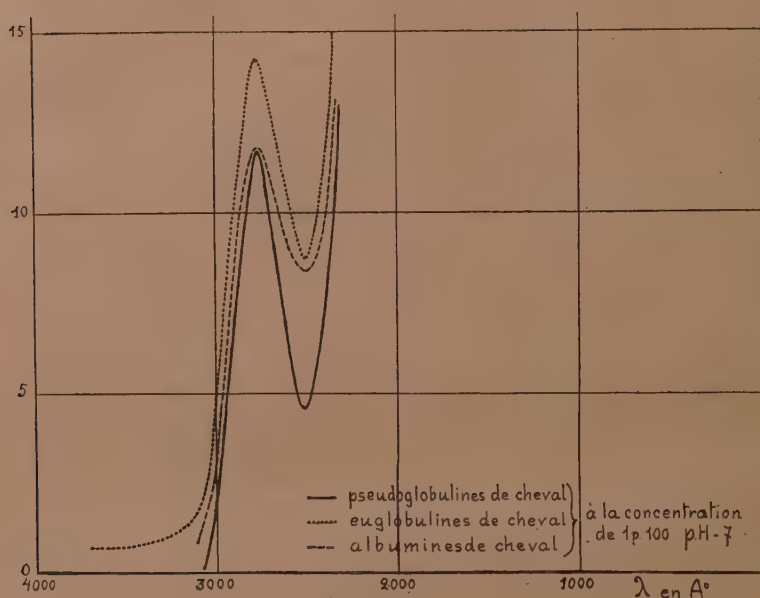


FIG. 5.

trois coefficients d'extinction au maximum de chaque fraction :

$$\begin{array}{rccccccc} \epsilon_M \text{ euglobulines} & + & \epsilon_M \text{ pseudoglobulines} & + & \epsilon_M \text{ albumines} & = & 81,2 \\ 28,2 & + & 28,0 & + & 25,0 & = & 81,2 \end{array}$$

Qu'il en est de même pour le coefficient d'extinction au minimum :  $\epsilon_m$  du sérum = 33.

Somme des coefficients d'extinction des fractions protéiques :

$$\begin{array}{rccccccc} \epsilon_m \text{ euglobuline} & + & \epsilon_m \text{ pseudoglobulines} & + & \epsilon_m \text{ albumines} & = & 37,4 \\ 14,3 & + & 5,0 & + & 18,1 & = & 37,4 \end{array}$$

7° SPECTRE D'ABSORPTION D'UN SÉRUM HUMAIN  
DONT LE RAPPORT EUGLOBULINES/PROTÉIDES TOTAUX  
A ÉTÉ AUGMENTÉ ARTIFICIELLEMENT.

Un sérum humain a été divisé en deux parties. Sa teneur en protéides totaux était de 66 gr. 9 par litre. Une partie de ce sérum a servi à en extraire les euglobulines. Celles-ci ont été dissoutes dans l'autre partie. On avait alors un sérum contenant 106 gr. 3 de protéides totaux par litre. Nous avons ramené cette teneur à sa valeur primitive par addition d'eau physiologique. Nous avons vérifié par dosage que la dilution avait été bien effectuée. On a obtenu ainsi un sérum dont le rapport englobulines/protéides totaux est fortement augmenté. Ce rapport dans notre expérience était égal à 46, alors que le sérum humain qui avait servi présentait un rapport égal à 27. La proportion des euglobulines par rapport aux autres constituants protéidiques est beaucoup plus élevée que dans le sérum normal. Chorine et Gillier [32] ont montré qu'un tel sérum possède toutes les propriétés sérologiques d'un sérum paludéen. Dans le cas de notre expérience la floculation du sérum normal dilué au 1/10 dans l'eau distillée (réaction de Chorine) donnait un chiffre égal à 2 au photomètre de Vernes, Brick et Yvon, alors que le sérum artificiellement enrichi en euglobulines présentait une floculation égale à 140.

Les spectres d'absorption de ces deux sérums photographiés dans les mêmes conditions par rapport à l'eau physiologique se sont montrés identiques, aux erreurs d'expériences près.

On voit donc bien que si les différentes fractions protéidiques du sérum présentent entre elles des différences quantitatives dans leurs spectres d'absorption dans l'ultra-violet, ces différences sont trop faibles par rapport au pouvoir d'absorption considérable de ces protéides pour pouvoir être mises en évidence dans des sérums où la proportion de ces fractions varie sans que la teneur totale en protéides change beaucoup. Or ceci est le cas de plusieurs sérums pathologiques et notamment le cas des sérums paludéens. Cela pouvait d'ailleurs se prévoir puisqu'on sait qu'un mélange convenable

d'acides aminés a les propriétés d'absorption d'un sérum et que, d'autre part, les différentes fractions protéidiques du sérum ne sont que des combinaisons d'un nombre plus ou moins élevé d'acides aminés.

#### CONCLUSIONS.

1° Le spectre d'absorption dans l'ultra-violet du sérum normal et celui du sérum paludéen sont identiques et pour la position du maximum et du minimum d'absorption et pour les coefficients d'extinction de ces deux points.

2° Le maximum d'absorption du sérum normal ou paludéen se trouve vers 2.775 Å. Son coefficient d'extinction est en moyenne de 39 pour le sérum normal et de 55,5 pour le sérum paludéen. On peut considérer ces valeurs comme égales, étant donné les conditions expérimentales et les erreurs inévitables.

3° Le minimum d'absorption du sérum normal ou du sérum paludéen est placé vers 2.520 Å. Le coefficient d'extinction de ce point est égal à 25 pour le sérum normal et à 24,8 pour le sérum paludéen.

4° Le rapport  $\frac{\text{Coefficient d'extinction au maximum}}{\text{Coefficient d'extinction au minimum}}$  est égal à 2,3 pour le sérum normal et à 2,2 pour le sérum paludéen. On peut considérer ces rapports comme égaux.

5° Le sérum normal ou paludéen séparé du caillot quatre heures ou vingt-quatre heures après la coagulation du sang présente le même spectre d'absorption.

6° Le sérum hémolysé montre dans le proche ultra-violet deux minima et un maximum situés pour les deux premiers points à 3.800 Å et à 3.200 Å et pour le maximum à 3.400 Å.

7° Le sérum des paralytiques généraux peut être spectrographiquement considéré comme sérum normal. Un seul cas examiné de sérum de malade atteint de délire aigu nous a donné aussi un spectre normal.

8° Les trois fractions protéidiques du sérum, à savoir les euglobulines, les pseudo-globulines et les albumines présentent une courbe d'absorption analogue à celle du sérum. Les longueurs d'onde du maximum et du minimum de ces frac-

tions peuvent être considérées comme étant les mêmes que celles du sérum.

9° Les euglobulines ont un coefficient d'extinction au maximum plus élevé que celui des deux autres fractions, qui présentent à ce point de vue des valeurs sensiblement égales.

10° Les pseudo-globulines ont un coefficient d'extinction au minimum plus bas que celui des deux autres fractions.

11° Les caractères spectrographiques d'absorption rapprochent les euglobulines des pseudo-globulines. Les albumines s'en éloignent nettement.

12° L'absorption d'un sérum dans la région ultra-violette qui s'étend de 3.000 Å à 2.400 Å (absorption due aux protéides sériques) est égale à la somme des absorptions des trois fractions protéidiques à la concentration où elles se trouvent dans le sérum.

13° Les variations naturelles du rapport euglobulines/protéides totaux, variations qui influent sur certaines propriétés sérologiques des sérums, sont sans influence sur le spectre d'absorption du sérum. Cela se conçoit si l'on songe à la grande opacité des protéides sériques pour les rayons ultra-violet, opacité qui varie peu d'une fraction à l'autre.

14° Une très forte augmentation du rapport euglobulines/protéides totaux, provoquée artificiellement par addition d'euglobulines, laisse le spectre d'absorption du sérum inchangé.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LECOMTE DU NOÛY (P.). *Méthodes physiques en Biologie et en Médecine*, 1933, Bailliére, éditeur, Paris.
- [2] DHÉRÉ (Ch.). Fribourg, 1909.
- [3] HENRI (M<sup>me</sup> V.), HENRI (V.) et WURMSER (R.). *C. R. Soc. Biol.*, **53**, n° 2, 1912, p. 319-320.
- [4] JUDD LEWIS (S.). *Proceed. Roy. Soc.*, série B, **89**, 1916, p. 327-335.
- [5] TADOKORO (T.). *J. infect. Dis.*, **26**, 1920, p. 1-7.
- [6] TADOKORO (T.) et NAKAYAMA (Y.). *J. infect. Dis.*, **26**, 1920, p. 8-15.
- [7] JUDD LEWIS (S.). *Proceed. Roy. Soc.*, série B, **93**, 1922, p. 178-194.
- [8] JUDD LEWIS (S.). *J. Chem. Soc.*, **115**, 1919, p. 312-319.
- [9] KOBER (P. A.). *J. Biol. Chem.*, **22**, 1915, p. 433-441.
- [10] WARD (F. W.). *Biochem. J.*, **17**, n° 6, 1923, p. 898-902.
- [11] MARCHLEWSKY (L.) et NOWOTNOVNA (M<sup>me</sup> A.). *Bull. intern. Acad. polonaise*, 5-6, A, 1925, p. 153-163.
- [12] ABDERHALDEN (E.) et HAAS (R.). *Zeitschr. Physiol. Chem.*, **66**, 1927, p. 78-83.



- [13] STENSTRÖM (W.) et REINHARD (M.). *J. Biol. Chem.*, **66**, 1926, p. 819-826.
- [14] HICKS (C. S.). *J. Chem. Soc.*, **127**, 1925, p. 771-776.
- [15] SMITH (F. C.). *Proceed. Roy. Soc.*, série B, **104**, 1929, p. 198-205.
- [16] HEWITT (L. F.). *Biochem. J.*, **21**, 1927, p. 216-224.
- [17] KARCZAG (L.) et HANAK (M.). *Biochem. Zeitschr.*, **245**, 1932, p. 166-173.
- [18] MLADEN PAIĆ. *C. R. Acad. Sc.*, **198**, 1934, p. 286.
- [19] MLADEN PAIĆ et HABER (P.). *C. R. Acad. Sc.*, **198**, 1934, p. 613.
- [20] LECOMTE DU NOÛY (P.) et (M.). *Ces Annales*, **49**, n° 2, 1932, p. 762-777.
- [21] LECOMTE DU NOÛY (P.). *La température critique du sérum. Actualités Scientifiques et Industrielles*, 1936. Hermann, éditeur, Paris.
- [22] LECOMTE DU NOÛY (P.) et AYNAUD (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **110**, 1932, p. 333-334.
- [23] LECOMTE DU NOÛY (P.) et (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1933, p. 1267-1269.
- [24] LECOMTE DU NOÛY (P.) et (M.). *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 1934, p. 308-310.
- [25] KEHAR (N. D.). *Rec. Malar. Surv. India.*, **111**, n° 1, 1932, p. 171-173.
- [26] BOYD (T. C.) et BOSE (B. K.). *Ind. J. Med. Res.*, **18**, n° 1, 1930, p. 267-273.
- [27] CHORINE (V.). *C. R. Soc. Biol.*, **127**, 1938, p. 170-172.
- [28] BERTRAND (G.). *C. R. du Lab. de Carlsberg*, série chimique, **22**, 1938, p. 67-72.
- [29] MEILLIÈRE (G.) et DE SAINT-RAT (L.). *J. Pharm. et Chimie*, 7<sup>e</sup> série, **25**, 1922, p. 100-103.
- [30] CHORINE (V.). *Ces Annales*, **60**, 1938, p. 633-651.
- [31] CHORINE (V.). *Arch. Inst. Prophylact.*, **10**, n° 3, 1938, p. 202-216.
- [32] CHORINE (V.) et GILLIER (R.). *Ces Annales*, **52**, 1934, p. 193-217.
- [33] CHORINE (V.). *Ces Annales*, **58**, 1937, p. 78-125.
- [34] HOFMEISTER (F.). *Arch. f. Exp. Path. Pharm.*, **24**, 188, p. 247.
- [35] CHICK (H.). *Biochem. J.*, **8**, 1914, p. 404-420.

# SUR LE DÉVELOPPEMENT DE *PROTEUS VULGARIS* EN ANAÉROBIOSE

- I. — LES NITRATES ACCEPTEURS D'HYDROGÈNE
- II. — LE GROUPEMENT —SH FACTEUR DE DÉPART

par MADELEINE MOREL.

(Service de Physiologie microbienne de l'Institut Pasteur.)

## I. — LES NITRATES ACCEPTEURS D'HYDROGÈNE.

On sait depuis longtemps que *Proteus vulgaris* peut se développer en anaérobiose dans les milieux usuels (Hauser, 1885). Quoique le développement de ce microbe dans un milieu de constitution chimique connue n'ait été obtenu qu'en 1938 par Fildes, un certain nombre de travaux relatifs aux composés ternaires susceptibles d'agir soit comme donateurs, soit comme accepteurs d'hydrogène, avaient cependant été publiés antérieurement. Le tableau I donne les résultats relatifs aux principaux composés carbonés étudiés comme donateurs d'hydrogène par Quastel et Wooldridge (1925), résultats confirmés par Braun et Vászârhelyi en 1932. Quastel et Wooldridge, Braun et Vászârhelyi ont également montré que le *Proteus* peut activer comme accepteurs d'hydrogène : très énergiquement les nitrates, légèrement l'acide fumarique et d'une façon négligeable les acides malique et aspartique. Il devait être possible, par couplage de donateurs et d'accepteurs convenables, d'obtenir une croissance anaérobie du *Proteus*. Effectivement, Quastel et Stephenson (1925) ont montré qu'en présence de lactate comme donateur d'hydrogène, la croissance anaérobie du *Proteus* était possible avec un nitrate comme accepteur, mais non avec le fumarate, le malate et l'aspartate de sodium. Il faut remarquer cependant avec Knight que les ensemencements ont été effectués à partir de bouillon et « qu'il n'est pas prouvé nettement qu'en anaérobiose la seule

TABLEAU 1. — Composés pouvant servir de donateurs d'hydrogène pour *Proteus vulgaris*.

	QUASTEL (1)	BRAUN (2)		QUASTEL	BRAUN
Acide formique . . .	+	+	Acide fumarique. . .		+
Acide acétique. . . .	+	0	Acide tartrique (1). . .	0	0
Acide propionique. . .	+	+	Acide malique (1) . . .		+
Acide butyrique. . . .	+	0	Acide malique inactif.		0
Acide lactique. . . . .	+	+	Acide glutarique. . . .	0	0
Acide pyruvique. . . .	+	+	Acide citrique . . . . .		0
Acide oxalique. . . . .	0	0	Acide glutamique . . .	+	+
Acide malonique. . . .	0		Glycérol. . . . .	+	+
Acide succinique. . . .	+	+			

(1) Quastel et Wooldridge (1926).  
 (2) Braun et Vásárhelyi (1932).  
 +, décoloration du bleu de méthylène en présence d'une suspension de *Proteus* dans une solution saline, en présence du substrat étudié comme donateur; 0, pas de décoloration.

exigence supplémentaire pour le milieu nutritif soit la substitution d'un accepteur d'hydrogène à l'oxygène de l'air ». Il est en tout cas certain que le bouillon apportait au milieu de l'acide nicotinique, que l'on sait aujourd'hui être indispensable au *Proteus*. Fildes (1938) a montré, en effet, que le *Proteus* ne peut être cultivé en milieu synthétique simple qu'en présence d'acide nicotinique, qui est le seul facteur de croissance pour cette bactérie. Il était donc intéressant de reprendre la question de la croissance du *Proteus* en anaérobiose dans un milieu synthétique, en présence d'acide nicotinique.

Toutes nos expériences ont été faites avec la souche X 49 « Syrie » de la collection de l'Institut Pasteur. Cette souche a été adaptée au milieu synthétique glucosé et entretenue dans ce milieu. Le milieu de base employé est le milieu de Lwoff et Querido (1938), dans lequel la concentration en phosphate a été doublée :

Phosphate monopotassique . . . . .	9 grammes.
Chlorure de potassium. . . . .	0 gr. 5
Sulfate d'ammonium. . . . .	0 gr. 75
Sulfate de magnésium . . . . .	0 gr. 05
Eau bidistillée. . . . .	1.000 cent. cubes.

Soude à 40 p. 100, q. s. pour pH 7,5.

Pour les expériences en aérobiose, le milieu est réparti dans des tubes à essai, à raison de 5 cent. cubes par tube ; pour les expériences en anaérobiose, dans des tubes de Weinberg, à raison de 2 cent. cubes par tube. Après stérilisation, on ajoute dans chaque tube :

1° 1 goutte de la solution suivante :

Citrate de fer . . . . .	0 gr. 1
Chlorure de calcium . . . . .	0 gr. 1
Eau bidistillée . . . . .	100 cent. cubes.

2° 1 goutte d'une solution d'acide nicotinique à  $1 \times 10^{-3}$ .

3° 1 goutte d'une solution à 15 p. 100 de l'aliment carboné choisi.

Nous savons déjà que le glucose et l'acide lactique (Fildes) conviennent très bien à la croissance du *Proteus*. Nous avons pu aussi adapter une souche de *Proteus* au pyruvate, au succinate et au fumarate (sels de sodium). Mais, alors qu'en présence de glucose, les cultures de *Proteus* se développent très bien dans des tubes à essai, nous n'avons obtenu une

TABLEAU II. — Croissance de *Proteus vulgaris*  
en présence de différents composés carbonés  
(d'après Quastel et Stephenson 1925)

DONATEURS d'hydrogène	ACCEPTEURS D'HYDROGÈNE		
	Oxygène	Acides fumarique malique, aspartique	Nitrate
Acide lactique . . . . .	?	0	+
Glycérol . . . . .	0	0	+
Acide glutamique. . . . .	+	0	+
Acide succinique . . . . .	(+)	0	(+)
Acide acétique . . . . .	(+)	0	(+)
Alanine. . . . .	(+)	0	0
Acide fumarique . . . . .	(+)	0	+
Acide malique . . . . .	(+)	0	+
Acide aspartique . . . . .	(+)	0	+

+, culture abondante; (+), culture nette mais peu abondante; 0, pas de culture visible.

multiplication abondante avec les souches adaptées aux autres substrats qu'à condition d'effectuer les cultures dans des fioles



d'Erlenmeyer de 100 cent. cubes, contenant chacune 10 cent. cubes de milieu. Nous avons alors tenté la culture en anaérobiose complète avec les souches adaptées aux différents substrats, et nous avons constaté, que dans le milieu indiqué, seul le glucose permet la croissance anaérobie du *Proteus*. Mais si nous ajoutons au milieu du nitrate de potassium à raison de 2 p. 1.000, ce nitrate, activé par le *Proteus*, peut être utilisé comme accepteur d'hydrogène et remplacer alors l'oxygène de l'air. Le *Proteus*, dans un milieu renfermant un nitrate, se développe en anaérobiose en présence de lactate, de pyruvate, de fumarate et de succinate. Nos résultats sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Croissance du *Proteus* en milieu synthétique en présence d'acide nicotinique.

ALIMENT CARBONÉ	AÉROBIOSE milieu seul	ANAÉROBIOSE	
		Milieu seul	Milieu + NO <sub>3</sub> K 1 p. 1.000
Glucose . . . . .	+	+	+
Acide lactique . . . .	+	0	+
Acide pyruvique . . . .	+	0	+
Acide succinique . . . .	+	0	+
Acide fumarique . . . .	+	0	+

0, pas de développement; +, développement très abondant.

Nos expériences confirment donc celles de Quastel et Stephenson (1923) pour les acides fumarique, succinique et lactique. Nous constatons en outre que le pyruvate de sodium convient très bien à la croissance anaérobie du *Proteus* en présence de nitrate de potassium.

## II. — LE GROUPEMENT —SH, FACTEUR DE DÉPART EN ANAÉROBIOSE.

Les résultats précédents ont été obtenus par ensemencement large : pour 2 cent. cubes de milieu, I à II gouttes d'une culture de vingt-quatre heures, dont la densité optique à

l'électrophotomètre de Meunier est environ 80 à 100 (une unité correspond à une diminution de la densité optique de 0,005 pour une lumière filtrée de  $\lambda$  moyenne efficace de 0,55  $\mu$ , l'épaisseur utile de la cuve étant de 10 millimètres). Avec desensemencements faibles (1 goutte de la même culture diluée dix fois), même en milieu au glucose, nous avons constaté une grande variabilité dans les résultats : le départ de la culture peut être immédiat, il peut être retardé de quelques jours, il peut même ne pas avoir lieu du tout. Nous n'avons jamais pu obtenir de culture en pratiquant l'ensemencement avec une souche diluée cent fois. Mais, en ajoutant au milieu 1 goutte d'eau peptonée à 2 p. 100 ou un composé contenant du soufre réduit, tel que le glutathion, la cystéine ou le sulfure de sodium, nous avons obtenu des cultures très régulières, même avec desensemencements très faibles, alors que les témoins restaient négatifs (v. tableau IV). Le soufre réduit

TABLEAU IV. — Développement du *Proteus* en anaérobiose après ensemencement faible en milieu glucosé.

Milieu témoin . . . . .	Pas de culture après 7 jours.
Milieu témoin + eau peptonée . . . . .	Départ en 24 heures.
Milieu témoin + glutathion $2,5 \times 10^{-6}$ . . . . .	Départ en 72 heures.
Milieu témoin + glutathion $2,5 \times 10^{-7}$ . . . . .	Départ en 96 heures.
Milieu témoin + cystéine $2,5 \times 10^{-5}$ . . . . .	Départ en 24 heures.
Milieu témoin + $\text{Na}_2\text{S}$ $2,5 \times 10^{-5}$ . . . . .	Départ en 24 heures.

L'ensemencement a été effectué avec 1 goutte d'une souche de 24 heures en milieu glucosé diluée 100 fois.

n'agit pas ici comme facteur de croissance, mais comme facteur de départ. Nous avons pu, en effet, entretenir une souche de *Proteus* en anaérobiose par repiquages en série (repiquages avec 1 goutte d'une culture anaérobie) ; nous avons pu ainsi effectuer 6 passages successifs, sans addition d'aucune substance au milieu synthétique de base glucosé, ce qui correspond à une dilution du milieu de culture initial de  $3 \times 10^6$ . Par ailleurs, dans le cas d'ensemencement faible où le soufre réduit favorise le départ des cultures, il n'y a aucune relation entre les quantités de soufre réduit présentes dans le milieu et la croissance du *Proteus*. Le développement étant com-

mencé, les cultures atteignent toutes environ la même densité optique. Notons que Quastel et Wooldridge (1929) ont constaté que la cystéine à la concentration de  $8 \times 10^{-4}$ , et divers composés contenant du soufre réduit, inhibent la croissance anaérobie, alors qu'ils sont sans effet sur la croissance aérobie du *B. coli*. Mais la concentration de cystéine que nous employons est environ trente fois plus faible que celle utilisée par les auteurs anglais.

DISCUSSION. — Pour Hosoya et Kishino (1925), les groupements —SH sont nécessaires au développement des anaérobies stricts. Quastel et Stephenson (1926) montrent qu'une quantité minimum de —SH doit être présente pour établir le potentiel d'oxydo-réduction convenable pour la croissance du *Clostridium sporogenes*. Par ailleurs, Knight et Fildes (1930) considèrent que  $E_h = + 0,1$  volts est le potentiel limite supérieur permettant le développement *in vitro* de *Cl. tetani*. Il est donc possible que, dans le cas d'anaérobies stricts, les groupements —SH agissent en établissant un certain potentiel d'oxydo-réduction.

Cette explication ne peut être valable pour le cas du *Proteus*, organisme anaérobie facultatif dont le développement aérobie, même à partir de cultures ensemencées très faiblement, n'exige pas l'addition de —SH au milieu de culture. Il semble que nous devions plutôt recourir ici à une interprétation voisine de celle donnée par Volkonsky (1932) au sujet du besoin de —SH chez les Saprolégniées : si les *Saprolegnia*, organismes aérobies, ont besoin d'une source de soufre réduit, c'est qu'ils ont perdu le pouvoir de réduire l'ion  $SO_4^{--}$ . Fildes et Richardson (1937), étudiant la nutrition de *Staphylococcus aureus* en milieu synthétique, trouvent également que le soufre doit être fourni sous forme réduite et ils considèrent que ceci est lié à l'impossibilité de réduire les sulfates. Nous pouvons interpréter nos expériences de la manière suivante : c'est qu'ils ont perdu le pouvoir de réduire l'ion  $SO_4^{--}$ , puisqu'il peut se multiplier avec un sulfate comme seule source de soufre. En anaérobiose, ce pouvoir existe également, puisque les souches peuvent être entretenues aussi avec un sulfate comme aliment sulfuré. Mais il est probable que la présence

d'une certaine quantité de soufre réduit dans le milieu est nécessaire en anaérobiose pour le *départ* de la culture, puisque le développement, en l'absence d'oxygène, se produit uniquement soit après ensemencement large, soit après addition d'une source de soufre réduit.

RÉSUMÉ. — 1° *Proteus vulgaris* peut se développer en anaérobiose dans un milieu synthétique additionné d'acide nicotinique.

2° Alors qu'en aérobiose, le glucose, les acides pyruvique, lactique, fumarique et succinique peuvent servir d'aliments carbonés, le glucose seul parmi les substances étudiées peut être utilisé en anaérobiose dans le milieu non additionné d'un accepteur d'hydrogène.

3° Cependant, les acides pyruvique, lactique, succinique et fumarique peuvent assurer la croissance du *Proteus* en anaérobiose en présence d'un accepteur d'hydrogène convenablement choisi : le nitrate de potassium.

4° Dans le milieu synthétique utilisé, les cultures en anaérobiose ne se développent qu'après ensemencement relativement abondant. Après ensemencement moyen, le départ de la multiplication est, soit retardé de quelques jours, soit complètement inhibé. Après ensemencement faible, il n'y a jamais de développement en anaérobiose, alors qu'il se produit normalement en aérobiose.

5° L'addition au milieu de culture d'une source de soufre réduit : glutathion, cystéine, sulfure de sodium, permet le départ immédiat des cultures en anaérobiose, même après ensemencement très faible. Cependant les groupements —SH ne représentent pas, pour le *Proteus*, un facteur de croissance. En effet, il est possible d'entretenir en série des cultures anaérobies de *Proteus* par ensemencement large dans un milieu dépourvu de groupements —SH exogènes. Les groupements —SH représentent donc un facteur de départ pour la croissance anaérobie du *Proteus* ensemencé faiblement.



## BIBLIOGRAPHIE

- BRAUN (H.) et VASARHELYI (J.). *Zentralbl. Bakt.*, **127**, I, 1932, p. 105.  
FILDES (P.). *Brit. J. Exp. Path.*, **21**, 1938, p. 239.  
FILDES (P.) et RICHARDSON (G. M.). *Brit. J. Exp. Path.*, **18**, 1937, p. 292.  
KNIGHT (B. C. J. G.). *Bacterial nutrition*, Londres, 1936.  
KNIGHT (B. C. J. G.) et FILDES (P.). *Bioch. J.*, **24**, 1930, p. 1490.  
HAUSER (G.). *Ueber Faulnisbakterien*, Leipzig, 1885.  
LWOFF (A.) et QUERIDO (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 1039.  
QUASTEL (J. H.) et WOOLDRIDGE (W. R.). *Bioch. J.*, **19**, 1925, p. 653 et **23**, 1929, p. 115.  
QUASTEL (J. H.) et STEPHENSON (M.). *Bioch. J.*, **19**, 1925, p. 661 et **20**, 1926, p. 1125.

# TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 67

Acétyles. Etude des radicaux — liés aux protéides sériques.	248 et 314
Acide p-aminobenzoïque. Action antisulfamide de l' — — en fonction du pH . . . . .	9
— succinique. Mutation de <i>Moraxella lwoffii</i> , se développant dans les milieux à l' — — . . . . .	94
Anaérobiose. Développement du <i>Proteus vulgaris</i> en — . . . . .	449
Antigènes. Réaction de Wassermann et ses — . . . . .	299
Antisulfamides. Sulfamide et —. Action du sulfamide sur le développement d' <i>Escherichia coli</i> et de <i>Proteus vulgaris</i> X 19. Voir aussi <i>Sulfamides</i> . . . . .	173
Antitoxine du vibron septique. . . . .	112
— du <i>B. histolyticus</i> . . . . .	389
Azote. Nutrition azotée des flagellés. . . . .	229
Bactéries. Systématique bactérienne. Famille des <i>Lactobacteriaceae</i> . . . . .	87
BCG. Vaccination par le — au moyen de scarifications cutanées. . . . .	161
Boré. Répartition du — dans les espèces végétales. . . . .	154
Cameroun. Etat de la Maladie du sommeil au — . . . . .	189
<i>Clostridium fallax</i> et <i>Clostridium pseudo-fallax</i> . . . . .	244
<i>Escherichia coli</i> . Action du sulfamide sur le développement d' — — . . . . .	173
Fer. Nutrition des flagellés. . . . .	229
Flagellés. Voir <i>Nutrition</i> .	
Homme. Spirochètes commensaux de l' — . . . . .	37
<i>Lactobacteriaceae</i> . Systématique bactérienne. Famille des — . . . . .	87
Maladie du sommeil au Cameroun en 1939. . . . .	189
<i>Moraxella lwoffii</i> . Mutation de — — se développant dans les milieux à l'acide succinique. . . . .	94

Nicotinamide. Usure de la — chez <i>Proteus vulgaris</i> . Voir aussi Pyridine. . . . .	285
Nutrition des flagellés. <i>Polytoma uvella</i> et <i>Polytoma obtusum</i> : Nécessité du fer, nutrition azotée. . . . .	229
Paludisme. Spectres d'absorption dans l'ultra-violet du sérum normal humain et du sérum de paludéen. . . . .	419
pH. Action antisulfamide de l'acide p-aminobenzoïque en fonction du —. . . . .	9
<i>Polytoma uvella</i> et <i>Polytoma obtusum</i> : Nécessité du fer, nutrition azotée. . . . .	229
<i>Polytomella caeca</i> . Action du sulfamide sur le flagellé — —. . . .	9
Protéïdes. Radicaux acétyles liés aux — sériques. . . . .	248 et 314
<i>Proteus vulgaris</i> . Usure de la nicotinamide chez — —. . . . .	285
— —. Sur le développement du — — en anaérobiose. . . . .	449
— — X 19. Action du sulfamide sur le développement de — —. . . .	173
Pyridine $\beta$ -sulfamide. Action de la — — considérée en raison de son analogie de constitution avec la nicotinamide. . . . .	240
Radicaux acétylés liés aux protéïdes sériques. . . . .	248 et 314
Rage. Caractère différentiel entre le virus rabique fixe et le virus de rue. . . . .	186
Sérum. Protéïques sériques. . . . .	248 et 314
— anti-histolytique. Titre antitoxique. . . . .	389
— anti-vibron septique. Titre antitoxique. . . . .	112 et
— normal humain et — paludéen. Spectres d'absorption dans l'ultra-violet des différentes fractions protéïdiques du —. . . .	419
Souris. Il n'est pas possible de tirer des passages de la — un caractère différentiel entre le virus rabique fixe et le virus de rue. . . . .	186
Spectres d'absorption dans l'ultra-violet du sérum normal humain et du sérum paludéen. — — dans l'ultra-violet des différentes fractions protéïdiques du sérum. . . . .	419
Spirochètes commensaux de l'homme. . . . .	37
Sulfamide. Action de la pyridine $\beta$ — — considérée en raison de son analogie de constitution avec la nicotinamide. . . . .	240
— et antisulfamides. Action du sulfamide sur le développement d' <i>Escherichia coli</i> et de <i>Proteus vulgaris</i> X 19. . . . .	173
— et antisulfamides. Action du — sur le flagellé <i>Polytomella caeca</i> . Action antisulfamide de l'acide p-aminobenzoïque en fonction du pH. . . . .	9

<i>Toxines.</i> Préparation, titrage et propriétés des toxines et antitoxines et du vibrion septique du <i>Bacillus histolyticus</i> . 112 et	389
<i>Tuberculose.</i> Vaccination par le BCG au moyen de scarifications cutanées. . . . .	161
<i>Ultra-violet.</i> Spectres d'absorption dans l' — — du sérum normal humain et du sérum paludéen. Spectres d'absorption dans l' — — des différentes fractions protéïdiques du sérum. . . . .	419
<i>Vaccination</i> par le BCG au moyen de scarifications cutanées. . .	161
<i>Végétaux.</i> Répartition du bore dans les espèces végétales. . .	154
<i>Vibrion septique.</i> Toxine et antitoxine du — —. . . . .	112
<i>Virus rabique.</i> Caractère différentiel entre le — — fixe et le virus de rue. . . . .	186
<i>Wassermann.</i> Réaction de — et ses antigènes. . . . .	299



# TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 67

## Notice nécrologique.

† GIOVANNI MALFITANO (1872-1941), par E. Pozerski . . . . . 5

AUDUREAU (Alice). — Voir LWOFF (André).

BAILLY (J.). — Voir REMLINGER (P.).

BERTRAND (Gabriel). — Les infiniment petits chimiques minéraux  
et les phénomènes de la vie. . . . . 216

— et SILBERSTEIN (Lazare). — Recherches sur la répartition du  
bore dans les espèces végétales. . . . . 154

BRETEY (J.). — Voir NÈGRE L.).

CHOUTEAU (J.). — Voir ROCHER (H.).

DUSI (Hisatake). — Voir LWOFF (André).

GUILLAUMIE (Maylis). — Détermination du titre antitoxique des  
sérums anti-*perfringens* A, anti-vibrion septique, anti-  
histolytique et anti-*œdematiens*. Préparation, titrage et  
propriétés des toxines correspondantes (troisième mé-  
moire). Toxine et antitoxine du vibrion septique. . . 112

— id. (quatrième mémoire). Etudes sur la toxine du *Bacillus*  
*histolyticus*. . . . . 389

LOTH (R.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).

LWOFF (André). — Voir MATTI (Jean).

— et AUDUREAU (Alice). — Sur une mutation de *Moraxella*  
*lwoffi* se développant dans les milieux à l'acide succinique. 94

LWOFF (André) et DUSI (Hisatake). — Recherches sur la nutrition  
des flagellés. I. — *Polytoma uvella* et *Polytoma obtusum* :  
Nécessité du fer, nutrition azotée. . . . . 229

—, NITTI (F.) et TREFOUËL (M<sup>me</sup> J.). — Recherches sur le sul-  
famide et les antisulfamides. III. — Action du sulfamide  
sur le développement d'*Escherichia coli* et de *Proteus vul-*  
*garis* X 19. . . . . 173

—, NITTI (F.), TREFOUËL (M<sup>me</sup> J.) et HAMON (M<sup>lle</sup> V.). — Recher-  
ches sur le sulfamide et les antisulfamides. I. — Action  
du sulfamide sur le flagellé *Polytomella caeca*. II. — Action

antisulfamide de l'acide p-aminobenzoïque en fonction du pH. . . . .	9
MATTI (Jean), NITTI (Frédéric), MOREL (Madeleine) et LWOFF (André). — L'action de la pyridine $\beta$ -sulfamide considérée en raison de son analogie de constitution avec la nicotinamide . . . . .	240
MOREL (Madeleine). — L'usure de la nicotinamide chez <i>Proteus vulgaris</i> . . . . .	285
— Sur le développement du <i>Proteus vulgaris</i> en anaérobiose. . . . .	449
— Voir MATTI (Jean).	
NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). — Vaccination par le BCG au moyen de scarifications cutanées (troisième mémoire). . . . .	161
NITTI (F.). — Voir LWOFF (A).	
NITTI (Frédéric). — Voir MATTI (Jean).	
PRÉVOT (A.-R.). — Etudes de systématique bactérienne. VI. — Critique de la famille des <i>Lactobacteriaceae</i> . . . . .	87
— et LOTH (R.). — Recherches biochimiques sur <i>Clostridium fallax</i> (W. et S.) et <i>Clostridium pseudo-fallax</i> nov. spec. . . . .	244
PRUDHOMME (R.-O.). — Spectres d'absorption dans l'ultra-violet du sérum normal humain et du sérum paludéen. Spectres d'absorption dans l'ultra-violet des différentes fractions protéïdiques du sérum. . . . .	419
REMLINGER (P.) et BAILLY (J.). — Il n'est pas possible de tirer des passages de la souris un caractère différentiel entre le virus rabique fixe et le virus de rue. . . . .	186
RÔCHER (H.) et CHOUTEAU (J.). — Recherches quantitatives sur la réaction de Wassermann et ses antigènes. . . . .	299
SÉGUIN (P.) et VINZENT (R.). — Les spirochètes commensaux de l'homme (deuxième mémoire). . . . .	37
SILBERSTEIN (Lazare). — Voir BERTRAND (Gabriel).	
TABONE (J.). — Etude des radicaux acétyles liés aux protéïdes sériques (premier mémoire). . . . .	248
— id. (deuxième mémoire). . . . .	314
TREFOUËL (M <sup>me</sup> J.). — Voir LWOFF (A.).	
VAUCEL (M.). — Etat de la Maladie du Sommeil au Cameroun en 1939. . . . .	189

# ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.)

**Séance du 6 novembre 1941.**

Présidence de M. JACQUES TRÉFOUËL.

---

## COMMUNICATIONS

### ÉPREUVES NÉGATIVES DE TRANSMISSION PAR L'ANOPHÈLE D'UNE SOUCHE ANCIENNE DE PALUDISME D'INOCULATION (*PLASMODIUM VIVAX*)

par E. ROUBAUD, V. CHORINE et P. GUIRAUD.

Le danger possible de diffusion du paludisme par les Anophèles présents dans le voisinage des centres de paludothérapie a été envisagé à différentes reprises. Si certains (1) affirment que ce danger est négligeable, les souches plasmodiennes formant rarement des gamétocytes au cours des passages successifs d'homme à homme, d'autres plus nombreux (Engel, Muhlen et Kirschbaum, Ruge, Michel et Maas, etc...) sont d'opinion contraire. Fischer et Martini (2), avec une souche de *Pl. vivax* au cent soixante-cinquième passage mécanique d'homme à homme, Ciuca et ses collaborateurs (3), au cent deuxième passage, ont infecté aisément des Anophèles.

Nous venons au débat le résultat des expériences ci-après qui

(1) BARZILAI-VIVALDI et KAUDERS. *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1924, 103, 744.

(2) Cités par H. RUGE. *Arch. f. Schiffs-u.-Trop. Hyg.*, 1928, 32, 237.

(3) M. CIUCA, L. BALLIF, M. CHELARESCU-VIERU. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1934, 27, 330.

ont porté sur une souche de *Pl. vivax* d'inoculation thérapeutique, beaucoup plus ancienne puisqu'elle est entretenue depuis l'année 1923 à l'Asile-Clinique de Sainte-Anne, à Paris.

Nous avons constaté que ce virus, uniquement conservé par voie de transmission mécanique chez l'homme et n'ayant jamais repris contact avec l'*Anophele* au cours de cette longue période, forme encore des gamétocytes dès les premiers accès, en nombre faible mais théoriquement suffisant pour permettre l'infection des moustiques.

Nous avons éprouvé, dans deux séries d'essais, l'aptitude de cette souche à évoluer chez l'*Anopheles maculipennis*. Les moustiques fraîchement issus d'élevages au laboratoire, appartenaient à la variété *atroparvus*, dont on connaît le rôle infectant en Europe septentrionale. Pour les besoins des expériences, ils étaient transportés de l'Institut Pasteur à l'Asile de Sainte-Anne, en cages de Roubaud, placées à 25° C en bouteilles thermos. Afin d'accroître les chances d'infection, nous avons répété les repas infectants d'un même lot de femelles et sur des malades différents, à plusieurs jours d'intervalle, les cages étant appliquées sur la région lombaire ou dorsale. Après le repas, les moustiques étaient maintenus à 25° C, sans autre nourriture que de l'eau.

EXPÉRIENCE N° 1. — a) *Repas infectants*. — Le 5 avril 1941, 32 femelles *atroparvus* nouvellement nées font un premier repas de sang sur M<sup>me</sup> L..., paralytique générale, impaludée le 12 mars par injection sous-cutanée de sang palustre. La malade est à son sixième accès, avec présence de gamétocytes rares. La plupart des moustiques se gorgent, au moins partiellement.

Le 7 avril, au cours du huitième accès, les moustiques font un deuxième repas infectant sur M<sup>me</sup> L... (présence de gamétocytes très rares).

Le 8 avril, les moustiques sont portés sur une deuxième malade, M<sup>me</sup> F..., impaludée le 23 mars et à son quatrième accès. Toutes les femelles se gorgent à nouveau fortement. Le 10 avril, quatrième repas infectant sur M<sup>me</sup> F... (cinquième accès, présence de gamétocytes rares). Le plus grand nombre des moustiques prennent encore du sang.

Du 11-16 avril, les moustiques, maintenus à 25° sans nouveau repas, sont mis à pondre. 9 d'entre eux sont disséqués. Aucune infection n'est décelée.

b) *Repas de transmission*. — Les 17 et 19 avril, les 23 femelles restantes sont portées sur une malade paralytique non impaludée, M<sup>me</sup> S... La plupart piquent, mais un petit nombre se gorgent de sang. Une femelle sacrifiée et disséquée ne montre pas d'infection.

Le 21 avril, tous les moustiques piquent activement M<sup>me</sup> S... Le 23, 16 d'entre eux se gorgent encore sur le même sujet (quatrième série de piqûres de transmission). Du 23 au 25 avril, 12 femelles sacrifiées et disséquées ne révèlent aucune infection sporocystique ou salivaire. M<sup>me</sup> S..., suivie régulièrement pendant plus d'un mois,



ne contracte pas d'infection palustre. Son sang demeure constamment négatif à l'examen. Le 23 mai, cette malade est inoculée par voie intraveineuse avec du sang de malade impaludée; elle fait son premier accès le 26; l'infection évolue normalement.

EXPÉRIENCE N° 2. — a) *Repas infectants*. — Le 12 juin 1941, une quarantaine de femelles récemment écloses sont mises à piquer sur une malade paralytique générale, M<sup>me</sup> B..., impaludée le 26 mai et à son septième accès. On dénombre : 3 gamètes pour 566 leucocytes, ou 36 gamètes par millimètre cube de sang. Les moustiques font un repas de sang abondant. Le repas infectant est renouvelé sur la même malade le 14 juin, repas partiel. Le 16 juin, les moustiques sont portés sur une deuxième malade M<sup>me</sup> Ca..., impaludée le 30 mai et à son troisième accès. La numération donne : 6 gamètes pour 260 leucocytes, ou 122 gamètes par millimètre cube de sang. Tous les moustiques se gorgent. Le 18 juin, ils refont un quatrième repas infectant sur M<sup>me</sup> Ca...

b) *Repas de transmission*. — Le 21 juin, après leur ponte, les 35 femelles restantes sont portées sur M<sup>me</sup> L..., paralytique générale non impaludée, qu'elles piquent abondamment. Les repas de transmission sont réitérés sur le même sujet le 23, le 25 et le 27 juin.

La malade, suivie pendant près d'un mois, n'a jamais présenté d'accès palustre, ni de parasites dans le sang. Inoculée le 21 juillet avec la même souche de virus prise à l'homme, elle fait son premier accès le 24 juillet et s'infecte normalement. Aucun des moustiques examinés de cette série n'a décélé d'infection.

De ces essais, que nous nous proposons de reprendre par la suite, nous croyons permis de conclure que la souche de *Pl. vivax* utilisée à l'Asile-Clinique de Sainte-Anne, dans le service de l'un de nous, ne présente plus un pouvoir infectant normal pour les Anophèles. Malgré la persistance d'apparition des gamétocytes, en quantité suffisante pour permettre l'infection des moustiques (4), cette souche n'a pas infecté des Anophèles placés dans des conditions qui auraient pu favoriser au maximum leur contamination. Nous pensons qu'il y aurait avantage à utiliser des souches analogues, peu ou non réceptives pour les Anophèles, dans les centres de paludothérapie où les malades peuvent être exposés à être piqués par des moustiques venus de l'extérieur.

(Institut Pasteur : Groupe des services de Parasitologie  
et Service du Dr Guiraud à l'Asile-Clinique de Sainte-Anne.)

M. Mollaret, s'appuyant sur l'expérience clinique de la paludothérapie expérimentale poursuivie à la Salpêtrière avec une souche

(4) SWELLENGREBEL et ses collaborateurs notent qu'en Hollande des porteurs sains de *Pl. vivax* renfermant un parasite pour 1.000 leucocytes sont aptes à infecter les Anophèles. Koninkl. Akad. Wetensch. Amsterdam, 1937, 40, 368.

d'hématozoaires entretenue depuis onze ans, confirme les observations de MM. Roubaud, Chorine et Guiraud. La production des gamétocytes, contrôlée au cours des passages, a toujours été en s'atténuant. L'épreuve de l'exflagellation pratiquée vers le septième ou huitième accès du malade est restée constamment négative. D'autre part, malgré la présence, en été, à la Salpêtrière de moustiques nombreux, parmi lesquels existent des Anophèles, il n'a jamais été observé de contamination. Il y a avantage à utiliser, pour la paludothérapie, non pas une souche quelconque d'hématozoaires, mais une souche entretenue depuis longtemps, dont les caractères présentent une fixité suffisante et dont la transmission par les moustiques, bien que restant peut-être théoriquement possible, a pratiquement cessé de se produire.

## INFLUENCE DE L'ANESTHÉSIE SUR LA TRANSMISSION DE LA RAGE PAR VOIE PULMONAIRE

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

On sait (P. Durand et H. Sparrow) que l'inoculation par voie respiratoire sous anesthésie à l'éther provoque, chez la souris notamment, des lésions pulmonaires massives ainsi qu'un développement local abondant des *Rickettsia* des virus historique, murin et boutonneux. M. Troisier et M<sup>lle</sup> Sifferlen ont montré d'autre part que, chez le singe et le cobaye, l'anesthésie générale permettait de réaliser facilement par simple instillation nasale, l'infection pulmonaire tuberculeuse. Ils ont insisté en outre sur le rôle nosogène du sommeil artificiel ou naturel. Le poumon a, avec la rage, des rapports moins éloignés qu'il ne semblerait *a priori*. Nous avons montré que, dans 38 p. 100 des cas, son parenchyme était susceptible de renfermer des neurones parasités, suffisamment nombreux pour déterminer, chez les animaux d'expérience, même par simple inoculation musculaire, l'éclosion de la maladie. Dans ces conditions, il ne nous a pas paru dénué d'intérêt de rechercher quel était l'effet de l'anesthésie sur l'inoculation nasale du virus rabique.

Chez des souris blanches ou des souris grises anesthésiées à l'éther jusqu'à complète résolution musculaire et maintenues suspendues en position verticale, on faisait tomber à l'ouverture des fosses nasales, à l'aide d'une fine pipette, II à III gouttes

d'une émulsion à 1 p. 100 d'un virus de rue fraîchement extrait de l'organisme du chien. La même instillation était pratiquée dans des conditions rigoureusement identiques sur des témoins non anesthésiés. Il va de soi que, dans les 2 cas, le moindre contact entre l'extrémité de la pipette d'une part, la peau et la muqueuse nasale d'autre part était évité avec le plus grand soin. Sur 27 souris anesthésiées, 9 (33,33 p. 100) ont pris la rage tandis que sur 25 souris non endormies, une seulement (4 p. 100) a contracté la maladie.

Troisier et Sifferlen, en instillant dans les narines de la souris, sous anesthésie à l'éther, 11 gouttes de suspension de BCG ont constaté l'arrivée quasi immédiate du bacille dans les cavités alvéolaires. De même, chez des souris anesthésiées à l'éther, on laisse tomber à l'ouverture des fosses nasales 11 fines gouttelettes d'une émulsion à 1 p. 50 de virus de rue. L'animal est sacrifié immédiatement. Les lobes pulmonaires sont extraits à l'exclusion de la trachée et des bronches. Le parenchyme, préalablement trituré avec du sable, est émulsionné dans de l'eau physiologique et l'émulsion inoculée sous la dure-mère du lapin. Trois expériences ont donné trois résultats positifs. L'émulsion de virus rabique instillée dans les cavités nasales chez la souris anesthésiée arrive donc directement et immédiatement dans les alvéoles pulmonaires où elle est absorbée. Cette observation explique la différence de comportement des souris non anesthésiées. Chez ces dernières, en possession de l'intégrité de leurs réflexes, la plus grande part de l'émulsion instillée est déglutie, donc inoffensive. Les petites quantités d'émulsion qui peuvent arriver à franchir la glotte sous l'influence de la pesanteur et grâce à la position verticale du corps, sont immédiatement rejetées par les réflexes expirateurs (toux, éternuement) et ne peuvent arriver jusqu'aux alvéoles. On peut se demander si, parmi les causes d'erreur qui grèvent les expériences positives d'absorption du virus rabique par la pituitaire, ne doit pas figurer une chute intra-alvéolaire de gouttelettes virulentes au cours d'une fausse déglutition.

Il semble en résumé que l'influence favorisante exercée par l'anesthésie sur les contaminations par voie respiratoire ne se limite pas aux Rickettsioses et aux bacilles tuberculeux mais s'étende à des agents pathogènes très différents et soit d'une application générale. L'anesthésie ne serait-elle pas susceptible de favoriser également les vaccinations par voie pulmonaire ? Nous avons échoué complètement dans des tentatives de vaccination antirabique entreprises cependant avec un microniseur donnant un brouillard à particules d'extrême ténuité. Peut-être des expériences de cette nature gagneraient-elles à être faites sous anesthésie.

(Institut Pasteur de Tanger.)

M. Lépine. — Il me semble que la première application de la transmission d'un virus par voie pulmonaire après anesthésie a été réalisée par Smith, Andrewes et Laidlaw en 1933, dans leurs expériences sur la transmission de l'influenza au furet et à la souris, suivis peu après par Francis et Magill, par Shope, etc. A l'heure actuelle, la transmission par voie pulmonaire après anesthésie, principalement chez la souris, est une méthode courante dans l'étude des virus. Elle est employée journellement pour la transmission du louping-ill, de la chorioméningite lymphocytaire, de la psittacose (Hornus), de la lymphogranulomatose inguinale (R. Schoen) et de nombre de virus, qui, les uns se contentent de traverser le poumon pour déterminer une infection générale, et les autres se développent localement en déterminant des pneumopathies d'aspect plus ou moins spécifique.

M. Nitti. — L'anesthésie inhibe les réflexes de défense et facilite chez l'animal l'infection pulmonaire par les voies aériennes supérieures. Ces faits sont classiques en ce qui concerne des germes figurés, tels que le pneumocoque par exemple. Nous avons encore récemment utilisé cette technique avec Lemaire et Cottet, pour montrer l'action protectrice des aérosols sulfamidés.

## RECHERCHES SUR LA FRÉQUENCE DES DIFFÉRENTS TYPES DE BACILLES TUBERCULEUX DANS L'INFECTION SPONTANÉE DU CHAT

par J. VERGE et F. SENTHILLE.

(Ce travail paraîtra sous forme de *Mémoire*  
dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.)



**NOUVELLES DONNÉES SUR LA RELATION EXISTANT  
ENTRE L'ENKYSTEMENT  
ET LA CONSERVATION DU POUVOIR PATHOGÈNE  
DES AMIBES DYSENTÉRIQUES, EN CULTURE**

par R. DESCHIENS.

Dans une communication présentée en 1937 (1) nous avons montré que certaines souches d'amibes dysentériques, *Entamoeba dysenteria*, Councilmar et Lafleur 1893, conservées à l'état végétatif, voyaient assez rapidement décroître leur pouvoir infectieux pour le chat (20 chats inoculés par la méthode de Meleney et Frye) alors que les mêmes souches soumises à un enkystement cyclique des amibes, conservaient sans modification leur taux infectieux et leur pouvoir pathogène. L'exemple le plus typique que nous donnions de ces faits était celui de la souche Dobell D. K. B. qui soumise à un enkystement cyclique, conservait depuis plus de douze ans un taux infectieux et un pouvoir pathogène pour le chat invariables. Nous avons depuis établi, pour une souche d'amibes d'origine marocaine N. K. D. comportant comme toute souche d'amibes dysentériques, des protozoaires et des bactéries associées, que la conservation du pouvoir infectieux, relevait de l'amibe et non de la flore bactérienne associée (2).

Nous apportons aujourd'hui des données nouvelles sur les relations existant entre l'enkystement et la conservation du taux infectieux et du pouvoir pathogène d'une souche d'amibes Dobell D. K. D. dont le taux infectieux et le pouvoir pathogène ont été établis et suivis d'une façon précise par C. Dobell, H. Meleney et W. Frye (3) et par nous-même.

En 1930, nous avons séparé de la souche D. K. B. cultivée sur le milieu à l'œuf de Dobell, additionné périodiquement de traces d'amidon de riz, facteur d'enkystement, un rameau D. K. B. 1 cultivé sur le même milieu sans addition d'amidon ; nous avons obtenu dans ces conditions par des repiquages appropriés, une culture d'amibes dans laquelle les protozoaires se maintenaient perpétuellement à l'état végétatif.

En 1939, après trois ans de culture du rameau D. K. B. 1 dans

(1) R. DESCHIENS. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1937, 30, 562.

(2) R. DESCHIENS. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1939, 32, 923.

(3) H. MELENEY et W. FRYE. *Am. J. Hyg.*, 1939, 29 (section C), 61.

les conditions relatées ci-dessus, le pouvoir pathogène pour le chat de ce rameau et de la souche initiale D. K. B. ont été étudiés. Il convient de noter qu'en 1936 et 1939, le taux infectieux pour le chat de la souche D. K. B. était de 75 à 83 p. 100 (20 chats inoculés suivant la méthode de Meleney et Frye par épreuve) suivant les séries d'inoculation (3 séries).

La technique d'inoculation utilisée dans nos recherches est celle que nous avons déjà décrite (4) antérieurement et que nous utilisons habituellement ; elle comporte en particulier l'injection après laparotomie, d'une quantité constante de matériel infectieux dans l'intestin grêle d'animaux de poids voisins, le chiffre des animaux éprouvé étant de 20 au moins par expérience suivant le test de E. Meleney et W. Frye.

Voici les résultats que nous avons obtenu :

*Rameau D. K. B. 1.* — Entre le 12 mai et le 15 juin 1939, 20 chatons de 600 à 900 grammes ont été inoculés par la voie intestinale haute après laparotomie avec 1 cent. cube de sédiment de cultures d'amibes de deux à trois jours (50.000 amibes environ par inoculat) du rameau D. K. B. 1 ; un de ces animaux a présenté une dysenterie amibienne, soit un taux infectieux de 5 p. 100. Entre le 15 juin et le 15 juillet 1939, 20 chatons ont été inoculés dans les mêmes conditions et aucun d'entre eux ne s'est infesté, soit un taux infectieux de moins de 5 p. 100.

*Souche initiale D. K. B.* — Entre le 9 mai et le 17 juillet 1939, 20 chatons de 500 à 1.000 grammes, ont été inoculés avec 1 cent. cube de sédiment de cultures d'amibes de deux à trois jours (50.000 amibes par inoculat) de la souche initiale D. K. B. ; 16, soit 80 p. 100 d'entre eux, ont présenté une dysenterie ou une colite amibiennes.

Il ressort de l'ensemble de ces données que les amibes du rameau D. K. B. 1, non soumises à l'enkystement cyclique ont vu après trois ans leur taux infectieux se réduire de 75-83 p. 100 à 5 p. 100 (1 p. 20), alors que les amibes de la souche D. K. B., qui s'enkystaient périodiquement ont conservé leur pouvoir infectieux à un taux de 80 p. 100.

L'analyse des conditions de culture de la souche D. K. B. et du rameau D. K. B. 1 fait apparaître les différences suivantes : 1° la souche d'amibes D. K. B. a été soumise à des alternances de température cycliques comportant dix jours de conservation à 37° sous la forme végétative, deux jours de conservation à 20° au moment de l'enkystement des amibes et trente jours de conservation à 4° des kystes lavés ; 2° cette même souche a été additionnée à un mois et demi d'intervalle environ, de traces d'amidon de riz stérilisé pour obtenir l'enkystement des amibes. Le rameau D. K. B. 1 au contraire n'a pas été soumis à ces actions.

(4) R. DESCHIENS. Ces *Annales*, 1938, 61, 5.

Les alternances de température auxquelles ont été assujetties les amibes de la souche D. K. B., appliquées aux amibes non enkystées du rameau D. K. B. 1 sont-elles capables seules de modifier le pouvoir pathogène pour le chat des amibes de ce rameau ? L'expérience montre que non : des amibes végétatives conservées sur milieu à l'œuf de Dobell à 4° meurent en effet, en dix à vingt jours ; pour que les amibes d'une souche supportent les variations physico-chimiques relatées ci-dessus, elles doivent être enkystées.

L'addition d'amidon de riz à elle seule ne représente pas davantage un facteur de conservation du taux infectieux d'une souche, car nous avons indiqué que des amibes cultivées à l'état végétatif sur des milieux comportant une quantité abondante d'amidon de riz stérilisé, voyaient leur taux infectieux et leur pouvoir pathogène se réduire après quelques mois.

Nous avons vérifié dans nos recherches, confirmant en cela les constatations de H. Meleney et W. Frye, que lorsque les chats s'infectent après avoir été inoculés avec une souche déterminée ils offrent une dysenterie amibienne dont la gravité est en rapport avec la souche utilisée ; cet indice pathologique (Pathogenic index de M. et F.) exprimé par le rapport entre la classe de gravité des lésions et la durée d'évolution, varie peu en fonction de l'enkystement ou du non enkystement des cultures ; au contraire la fréquence de l'infestation chez les animaux inoculés c'est-à-dire le taux infectieux, varie ou reste fixe en fonction du temps suivant que les cultures sont conservées à l'état végétatif, ou soumises à l'enkystement ; aussi avons-nous choisi comme test de la valeur pathogène d'une souche d'amibes son taux infectieux pour le chat.

Les travaux récents de M. et F. sur la conservation du pouvoir pathogène en culture de 7 souches d'amibes dysentériques, entretenues en culture pendant deux à six ans, n'infirmant pas les résultats que nous avons observés : dans 5 cas sur 7, en effet, le taux infectieux des souches étudiées par ces auteurs s'est abaissé de plus de 50 p. 100. La souche D. K. B. en particulier éprouvée par M. et F. après deux ans de culture à l'état végétatif a vu fléchir son taux infectieux de 72,7 p. 100 à 30 p. 100.

Il ressort de nos recherches portant sur les 2 souches d'amibes dysentériques N. K. D. et D. K. B., que les conditions de l'enkystement cyclique des amibes et de la conservation des kystes formés peuvent assurer la conservation du pouvoir pathogène des parasites à un taux infectieux donné. Cette constatation ne saurait surprendre, l'enkystement obtenu artificiellement en culture permettant de réaliser des alternances de phases végétatives et enkystées des amibes se rapprochant de leur évolution naturelle.

(Institut Pasteur,  
Groupe des Services de Parasitologie.)

## ÉTUDE SUR LA LONGÉVITÉ DES BACTÉRIES ANAÉROBIES NON SPORULÉES

par A.-R. PRÉVOT.

Les bactéries anaérobies non sporulées sont généralement considérées par les classiques comme ayant une vie très brève : huit jours pour *Rist. fragilis*, quinze jours pour les *Veillonella*, trois semaines à un mois pour *Ramibact. ramosum*, un à trois mois pour les streptocoques anaérobies. Rares sont les espèces dont la longévité est fixée à plus de six mois. Or l'étude de ce caractère, entreprise en 1922 et portant ainsi actuellement sur une période de dix-neuf années et sur plusieurs centaines de souches, m'a permis d'observer des faits apportant un jour nouveau sur cette question. Ainsi sur 16 souches de *Ramibact. ramosum* isolées de 1922 à 1927, 13 n'ont pas vécu plus de six mois, mais, par contre, 3 ont survécu quatorze ans en tubes scellés dans le vide et conservés à l'abri de la lumière, à température ordinaire, sans repiquage. Dans les mêmes conditions, j'ai pu conserver seize ans l'unique souche de *Ramibacterium pseudo-ramosum* que j'ai pu isoler (alors que *R. ramosoides* n'a survécu que deux ans); onze ans 1 souche de *Propionibacterium pentosaceum*; quatorze ans 11 souches de *Fusiformis biacutus* sur plus de 20 isolées; quatre ans toutes mes souches de *Fusocillus girans*; treize ans 1 souche de *Ristella insolita*; treize à quinze ans les 3 souches de *Ristella clostridiiformis* que j'ai isolées; quatorze ans 1 souche de *Staphylococcus anaerobius*; neuf ans 2 souches de *Staphylococcus aerogenes*; huit ans 1 souche de *Diplococcus magnus*; dix-huit ans 1 souche de *Streptococcus putridus* (sur plus de 20 isolées), neuf ans 1 souche de *Streptococcus faetidus* (sur 25 isolées). Par contre, toutes mes souches de *Diplococcus constellatus*, de *Streptococcus intermedius*, de *Streptococcus micros*, de *Veillonella*, de *Spherophorus* n'ont pas pu être gardées plus d'un à deux ans, et la plupart de mes autres souches n'ont vécu que quelques mois ou mêmes quelques semaines.

Ces faits appellent quelques remarques et provoquent une hypothèse.

D'abord si les observations anciennes des classiques assignaient une vie si brève aux anaérobies sporulés c'est parce que : 1° ils n'ont observé qu'un très petit nombre de souches de chaque espèce, et ce, pendant un temps trop bref; 2° leurs méthodes de conservation étaient nettement défectueuses, en particulier le vide qu'ils



provoquaient dans leurs tubes, trop peu poussé. Nous employons actuellement des pompes à vide au 1/10 mm. de Hg. La nature du milieu joue également un grand rôle dans la longévité d'une souche. Ainsi les cultures en bouillon Martin ne vivent pas longtemps. Par contre, les cultures en bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000 ou en bouillon VF non glucosé, mais additionné d'un cube de blanc d'œuf coagulé ont donné les meilleurs résultats. Toutes nos observations sur la longévité des anaérobies ont été faites sur des cultures en bouillon VF glucosé à 2 p. 1.000, qui nous semble être actuellement le meilleur milieu de conservation pour les anaérobies.

A signaler que les bouillons additionnés d'extrait de viande de Liebig sont impropres à la conservation des anaérobies et que toutes les souches qui ont séjourné quelques semaines dans ce milieu sont mortes.

Ensuite, il faut insister sur le fait que, pour une espèce donnée, la longévité est très grande pour certaines souches et très petite pour d'autres, fait qui est à rapprocher de ce qu'on observe dans le monde animal ou végétal : pour une espèce donnée, il y a des individus ou des lignées à vie brève et d'autres à vie longue. Ainsi certains êtres humains ne vivent que quelques heures et d'autres dépassent le siècle, et on a des lignées humaines où la moyenne des individus meurent jeunes, et d'autres, où la moyenne vit très longtemps.

Enfin, une hypothèse de travail est à envisager : pour les bactéries sporulées, la longévité est en général indéfinie (sauf certaines espèces comme *Welchia perfringens* par exemple, qui ne vivent guère plus d'un an). Dans le cas des anaérobies sporulés, la longévité est incontestablement liée à l'existence de la spore, car dans les milieux où la spore n'apparaît pas, l'espèce considérée ne vit pas longtemps (c'est d'ailleurs le cas de *W. perfringens* dont la spore apparaît rarement dans les milieux de culture). D'autre part, on sait qu'en règle générale la forme végétative n'a pas de longévité marquée. Quel est donc l'organite bactérien qui assure la longévité des espèces non sporulées ?

Quand on examine au microscope, à l'état frais, une culture bactérienne non repiquée depuis dix à quinze ans, on ne voit plus en général de formes végétatives. On voit, difficilement d'ailleurs, des débris de corps microbiens, qui, après étalement, dessiccation et fixation, ne prennent presque plus les colorants habituels. A l'ultramicroscope, par contre, on remarque un nombre plus ou moins grand et parfois considérable de très petits corpuscules brillants, à la limite de la visibilité, animés de mouvements browniens extrêmement vifs qui, après étalement et fixation, se colorent encore fortement en violet s'il s'agit d'espèces Gram-positives, en rouge s'il s'agit d'espèces Gram-négatives et si la coloration de contraste est le Ziehl dilué. L'hypothèse la plus naturelle qui vient à l'esprit est que ces corpuscules très petits

sont le substratum de la longévité ; ce sont eux peut-être aussi qui passent à travers les bougies de porcelaine dont les pores ne sont pas trop serrés :  $L_1$  ou  $L_2$ . En tout cas, il y a certainement un rapport entre les granules et la reprise des germes, car dans les sédiments où ils sont abondants, la reprise du microbe se fait en quelques heures et dans les sédiments où ils sont rares, la reprise du germe exige un délai plus long, deux à trois jours, quelquefois plusieurs semaines et même plusieurs mois. Disons pour finir que ces corpuscules ne sont aucunement thermorésistants et meurent à  $55^\circ$ , ce qui les distingue indubitablement de la spore.

*Conclusion* : 1° La longévité des anaérobies non sporulés varie considérablement d'une souche à l'autre pour une espèce donnée. Il ne faut donc pas attacher une valeur absolue en tant que caractère diagnostique aux durées de longévité assignées aux espèces par les classiques. 2° Les méthodes modernes de culture (bouillon VF glucosé, vide très poussé, conservation dans l'obscurité absolue) ont augmenté la durée de conservation des souches. 3° Les organites qui assurent la longévité des anaérobies non sporulés seraient les corpuscules réfringents minuscules, colorables par le violet de gentiane phéniqué ou la fuchsine de Ziehl diluée, non thermorésistants, qui persistent dans les sédiments microbiens des cultures âgées, longtemps après la dislocation et la disparition totale des formes végétatives.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

## RECHERCHES BIOCHIMIQUES COMPARÉES SUR *CL. BIFERMENTANS*, *CL. SORDELLII* ET *CL. AEROFÆTIDUM*

par A.-R. PRÉVOT et P. CORDIER.

Les travaux de Clark et Hall [1937] (1) ont établi qu'il existe une certaine parenté entre *Cl. bifermentans* et *Cl. sordellii* en dehors de leur grande ressemblance morphologique et physiologique. En effet ces auteurs ont mis en évidence une agglutination croisée, faible il est vrai, et un certain degré d'immunité passive conférée au cobaye par le sérum de lapin anti-*bifermentans*, vis-à-vis de faibles doses de toxine de *Cl. sordellii* (5 à 10

(1) CLARK et HALL. *Proc. 38 Ann. Meet. Soc. Am. Bact. J. Bact.*, 1937, 23, 33.

D. M. M.). Néanmoins, Clark et Hall concluent que l'absence de pouvoir pathogène de *Cl. bifermentans* et le haut pouvoir pathogène de *Cl. sordellii* plaident en faveur de l'autonomie de ce dernier. En 1938, S. Stewart (2) a repris la question et constaté que le sérum de lapin immunisé contre les souches de *Cl. bifermentans* protège la souris contre 2 à 5 D. M. M. de toxine *sordellii*. Elle en conclut que les deux espèces sont identiques et propose pour elles le nom unique de *Cl. bifermentans* qui a la priorité. Cette façon de voir a été suivie par R. Lillie en 1938 (3), et adoptée par Breed, Murray et Hitchens dans la 5<sup>e</sup> édition du Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology*, qui réunissent les deux espèces sous le nom de *Cl. bifermentans*, se bornant à mentionner que les souches toxiques de *bifermentans* ont été appelées transitoirement *Cl. sordellii*.

Ces faits sont graves. Il ne s'agit pas seulement ici de la spoliation d'une espèce regardée jusqu'ici comme parfaitement autonome, eu égard à son pouvoir pathogène si spécial et si marqué (la toxine de *Cl. sordellii* est en effet la troisième dans l'ordre décroissant de toxicité puisque sa D. M. M. est de l'ordre du 1/50.000 de centimètre cube venant donc juste après celles du *Cl. botulinum* (ordre du 1/1.000.000 de centimètre cube) et du *Pl. tetani* (ordre du 1/200.000 de centimètre cube).

C'est donc tout le problème de l'espèce bactérienne qui est remis en question, puisque les auteurs américains (et ces faits sont à rapprocher de ceux mis en lumière par Drack, Dragstedt, Johnson, etc., qui ont identifié les espèces *funduliformis* et *necrophorus* que nous considérons comme différentes bien que parentes) tendent à considérer comme identiques des groupes de souches dont les unes ne sont ni pathogènes, ni toxiques, avec des groupes de souches hautement pathogènes et toxigènes.

Aussi considérons-nous que de nouvelles recherches doivent être reprises pour éclairer ce grave problème, et dans le présent travail nous avons cherché si la détermination du type fermentaire de ces espèces pouvait apporter un fait nouveau dans la question. Nous avons, de plus, jugé logique de rapprocher des espèces *bifermentans-sordellii* l'espèce *aerofetidum* qui, à notre avis, en est morphologiquement et physiologiquement très voisine.

Nous avons donc soumis à notre technique habituelle 4 souches de *bifermentans* choisies comme les plus typiques parmi les 9 de notre collection. Ce sont les souches : « T-M », qui nous a été donnée il y a dix-huit ans par notre collègue Tissier et qui constitue par cela même la souche historique ; « St » isolée en mars 1940 de la moelle osseuse d'un mouton mort d'une infection indéterminée, matériel qui nous a été donné par notre collègue

(2) S. STEWART. *J. Bact.*, 1938, 35, 13.

(3) R. LILLIE. *Publ. Health. Rep.*, 1938, 53, 113.

Staub ; « 221 » isolée en 1927 d'une appendicite aiguë ; « Ch » isolée en février 1939 de jambons avariés. Aucune de ces souches n'a montré le moindre pouvoir pathogène ni toxigène, elles sont de plus du même type antigénique.

L'unique souche de *Cl. sordellii* que nous avons pu étudier est la souche 82 qui nous a été donnée par Sordelli et constitue ainsi la souche historique. Les 2 souches de *Cl. aerofoetidum* que nous avons étudiées sont la souche historique « W-S », conservée à l'Institut Pasteur depuis sa découverte, et la souche « 99 » isolée en 1924 d'une appendicite aiguë. Toutes deux ont été pathogènes, mais toutes deux ont perdu leur pouvoir pathogène.

Nous avons résumé dans le tableau suivant les résultats de nos investigations :

Souches . . . . .	ESPÈCES						
	<i>Cl. bifermentans</i>				<i>Cl. sordellii</i>	<i>Cl. aerofoetidum</i>	
	T-M	St	221	Ch	82	W-S	99
SH <sub>2</sub> . . . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
NH <sub>3</sub> (pour 400 cent. cubes de culture) . .	0,0544	0,051	0,105	0,034	0,0612	0,0034	0,0442
Amines volatiles . .	+	+	+	+	+	Traces.	Traces.
Ethanol . . . . .	+	+	+	+	+	0	0
Aldéhydes . . . . .	+++	++	++	++	+++	++	+
Cétones . . . . .	+	+	+	+	+	+	+
Indol . . . . .	+	++	+	+	++	Traces.	+
Phénol . . . . .	0	0	0	0	0	0	0
Crésol . . . . .	0	0	0	0	0	0	0
Scatol . . . . .	0	0	0	0	0	0	0
Acétylméthylcarbinol .	0	0	0	0	0	0	0
Acidité volatile pour 400 cent. cubes de culture, en grammes.	0,283	0,276	0,621	0,259	0,360	0,159	0,331
pH . . . . .	5	5	5	5	5	5	5
Acides volatils. . . .	Acét.	Acét.	Acét.	Acét.	Acét.	Acét.	Acét.
	Butyr.	Butyr.	Butyr.	Butyr.	Butyr.	Butyr.	Butyr.
	Valér.	Valér.	Valér.	Valér.	Valér.	Valér.	Valér.
Acides fixes . . . . .	Lact.	Lact.	Lact.	Lact.	Lact.	Lact.	Lact.

On voit par là que :

1° Les produits terminaux de la fermentation du bouillon VF glucosé à 1 p. 100 sont les mêmes pour les espèces *bifermentans* et *sordellii* soit : SH<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, amines volatiles, éthanol, aldéhyde, cétone, indol, acides acétique, butyrique, valérienique et lactique (prédominance de l'acide acétique, petite quantité seulement d'acide butyrique) et qu'ainsi la méthode biochimique ajoute une nouvelle similitude aux autres déjà établies.

2° L'espèce *aerofoetidum* est très voisine des deux premières



puisqu'elle donne  $\text{SH}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , amines volatiles, aldéhyde, cétone, acides acétique, butyrique, valérianique et lactique. Le seul corps que *Cl. aerofoetidum* ne produit pas est l'éthanol, tout au moins dans nos conditions d'expérience.

Ces trois espèces sont donc nettement très proches parentes puisqu'à leurs similitudes morphologiques et physiologiques s'ajoute leur similitude biochimique ; et ceci justifie leur rapprochement dans le même sous-genre, proposé par l'un de nous en 1940 (4) où elles figurent l'une à côté de l'autre. Mais à notre avis, toutes ces similitudes ne justifient aucunement l'identification de *Cl. sordellii* à *Cl. bifermentans*, proposée par les auteurs américains et nous devons considérer, jusqu'à plus ample informé l'espèce *Cl. sordellii* comme parfaitement autonome. Cette autonomie se justifie par quatre faits capitaux :

1° *Cl. bifermentans* n'est jamais pathogène en culture pure et jamais toxigène même en association, alors que *Cl. sordellii* est hautement pathogène et toxigène en culture pure (on ne peut exciper de la perte d'un pouvoir pathogène de *Cl. sordellii* qui se transformerait ainsi en *Cl. bifermentans* puisque toutes les souches connues de *Cl. sordellii* ont conservé intégralement depuis quinze ans leur haut pouvoir pathogène). De plus *Cl. sordellii* est hémolytique alors que *Cl. bifermentans* ne l'est pas.

2° L'odeur des deux espèces est nettement différente. Dans les mêmes conditions de cultures, *Cl. bifermentans* a une odeur de fromage fermenté très avancé alors que *Cl. sordellii* a une odeur nettement fécaloïde, une des plus nauséabonde connue.

3° Le pouvoir protéolytique de *Cl. sordellii* est nettement plus élevé que celui de *Cl. bifermentans*.

4° Le pouvoir glucidolytique de *Cl. sordellii* est plus restreint que celui de *Cl. bifermentans*, en particulier le premier n'attaque ni le glycérol ni le sorbitol, alors que le second les fait fermenter. Le fait qu'il existe un antigène commun entre les deux espèces n'est pas une preuve formelle d'identité, puisqu'on connaît maintenant de nombreux cas où un antigène est commun à des espèces très différentes.

En résumé, les espèces *bifermentans*, *sordellii* et *aerofoetidum* sont très voisines, et appartiennent en particulier au même type fermentaire acéto-butyro-valéro-lactique. Mais il existe par ailleurs suffisamment de différences entre elles pour continuer à les considérer comme autonomes.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

(4) A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*. 1 vol. Masson, édit., Paris, 1940, 132-133.

## DÉTERMINATION DE LA TAILLE DU VIRUS VACCINAL PAR L'ULTRACENTRIFUGATION ET LE MICROSCOPE A FLUORESCENCE

par P. LÉPINE, JEAN C. LEVADITI et J. GIUNTINI.

L'invisibilité des ultravirus impose ordinairement, dans les expériences comportant des déterminations de taille (ultracentrifugation ou ultrafiltration), un titrage sur l'animal, avec le facteur d'imprécision inhérent, pour des raisons pratiques ou physiologiques, à ce mode d'essai biologique.

Nous avons essayé, profitant de la possibilité donnée par le microscope à fluorescence (Hagemann) de numération des corpuscules élémentaires vaccinaux, de mesurer la taille de ces derniers par l'ultracentrifugation sans recourir à l'inoculation à l'animal.

Des suspensions de virus vaccinal sont préparées à partir de membranes allantoïdes d'œuf de poule traitées selon la méthode de Smadel et Wall (1) et le nombre des corpuscules élémentaires y est déterminé au microscope à fluorescence avec la cellule spéciale en suivant la technique de C. Levaditi et collaborateurs (2).

Nous considérons comme négligeable la présence de corpuscules « normaux » qui accompagnent le virus jennérien et qui, s'ils en sont morphologiquement et immunologiquement différents (2), ne peuvent être distingués en lumière de Wood des corpuscules virulents [J. Levaditi et J. Giuntini (3)]. En effet, les différences notées par C. Levaditi (4) dans la vitesse de sédimentation entre ces corpuscules et le virus vaccinal étant de l'ordre de grandeur de l'erreur-type de la méthode, elles sont pratiquement sans influence sur les résultats.

Les suspensions sont alors ultracentrifugées dans l'appareil précédemment décrit [P. Lépine (5)] et de nouvelles numérations pratiquées sur des échantillons prélevés dans des conditions déterminées.

(1) J. SMADEL et M. J. WALL. *J. exp. Med.*, 1937, **66**, 328.

(2) C. LEVADITI et collaborateurs. *Ces Annales*, 1940, **64**, 359 et 466.

(3) J. LEVADITI et J. GIUNTINI. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **134**, 375.

(4) C. LEVADITI. *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 1180.

(5) P. LÉPINE. *Ass. Micr. L. Franç. Ces Annales*, 1941, **67**, 380.

Les formules applicables au calcul par la centrifugation des dimensions des particules sont, sauf l'une de celles de Mc Intosh et Selbie (6), dérivées de la loi de Stokes [Bechhold et Schlesinger (7)] adaptée aux conditions particulières à chaque expérimentateur [Schlesinger (8) : appareil Sharples; Elford (9) : centrifuge Ecco et méthode du « capillaire inversé »]. Le dispositif de Mc Intosh et Selbie étant celui qui présentait le plus d'analogie avec le nôtre, nous avons employé, non pas la formule empirique de ces auteurs dont les résultats n'ont pas cadré avec nos données, mais celle qu'ils ont obtenue en combinant leur mode de calcul avec la formule d'Elford (cette dernière étant mal applicable à notre centrifuge).

Nous obtenons ainsi la formule suivante pour une particule supposée sphérique :

$$d = 7,94 \cdot 10^7 \sqrt{\frac{\eta}{(\sigma_p - \sigma_m) N^2 \cdot R}} \times \frac{1}{t} \log \frac{C_0}{C_t}$$

dans laquelle  $d$  est le diamètre en  $m\mu$  de la particule,  $\eta$  la viscosité du milieu (solution tampon à pH 7,2),  $\sigma_p$  la densité de la particule (nous avons adopté la valeur 1,3 comme étant la plus probable),  $\sigma_m$  la densité du milieu,  $N$  la vitesse (nombre de tours) de l'ultracentrifuge,  $t$  la durée de la centrifugation, et enfin  $R$  la distance moyenne des particules à l'axe de rotation.

Si  $r_1$  est la distance du ménisque de la cellule de plexiglas à l'axe de rotation avant le prélèvement d'une hauteur  $h$  de liquide, et  $r_2$  la distance du ménisque à l'axe après ce prélèvement, on a :

$$R = \frac{r_1 + r_2}{2}.$$

Les dimensions de notre appareil ont été calculées de façon que pour un prélèvement de  $h = 5$  millimètres on ait  $R \approx 1$ . Le volume prélevé, pour l'ensemble des trois cellules, est 0,06 cc. à 0,12 cc. suivant le diamètre de celles-ci. Pour la numération, ce volume est dilué dix fois dans la solution tampon à pH 7,2 avec la seringue au 1/100 de centimètre cube qui sert aux prélèvements.

Voici résumées les deux séries d'essais que nous avons pratiqués dans des conditions différentes (voir page suivante) :

Nos deux séries d'expériences donnent donc, pour le virus de la vaccine, une taille moyenne de 179,4 et 178,8, soit une moyenne générale de 179,1  $m\mu$ .

D'après les mêmes expériences, les tailles extrêmes seraient de

(6) J. MC INTOSH et F. R. SELBIE. *Brit. J. exp. Path.*, 1937, **18**, 162.

(7) H. BECHHOLD et M. SCHLESINGER. *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **236**, 387.

(8) M. SCHLESINGER. *Zeitschr. Hyg. u. Infektionskr.*, 1932, **114**, 161.

(9) W. J. ELFORD. *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 399.

## Première série. Éléments variables.

$t$ (minutes)	N	R (centimètre)	$C_0$	$C_t$	$\frac{1}{t} \log \frac{C_0}{C_t}$	$d$ (m $\mu$ )
3 . . . . .	35.600	1,1	$63.10^7$	$39.10^8$	0,34283	227,8
4 . . . . .	31.750	1	$63.10^7$	$110.10^8$	0,18949	193,7
5 . . . . .	32.750	1,1	$63.10^7$	$24,5.10^8$	0,28203	224,1
10 . . . . .	49.000	1	$32,5.10^7$	$1,92.10^8$	0,22285	139,7
15 . . . . .	39.000	0,9	$32,5.10^7$	$25.10^8$	0,07426	106,8
Moyenne : $\frac{\Sigma d}{5} = \frac{897,1}{5} = 179,4$ m $\mu$ .						

## Deuxième série. Éléments constants.

Dans tous les essais : N = 32.600    R = 1     $C_0 = 6,3.10^8$ .

$t$	$C_t$	$\frac{1}{t} \log \frac{C_0}{C_t}$	$d$ (m $\mu$ )
4 . . . . .	$6,7.10^7$	0,24332	219,3
6 . . . . .	$4,76.10^7$	0,18695	192,2
8 . . . . .	$3,5.10^7$	0,15691	176,1
10 . . . . .	$3,32.10^7$	0,12782	159
12 . . . . .	$3,04.10^7$	0,10970	147,3
Moyenne : $\frac{\Sigma d}{5} = \frac{893,9}{5} = 178,8$ m $\mu$ .			

227,8 et 219,3, moyenne 223,5 m $\mu$  pour la maxima, et de 106,8 et 147,3 moyenne 127 m $\mu$  pour la minima.

Il ne faut toutefois accorder à ces derniers chiffres qu'une valeur relative. En réalité, la marge de taille du virus est plus étroite que ces résultats ne le laissent supposer. En effet, d'une part, pour les durées de centrifugation inférieures à cinq minutes, il conviendrait, pour plus de précision, d'introduire une correction tenant compte des temps d'accélération et d'arrêt non compris dans les calculs, l'absence de cette correction donnant des valeurs trop grandes ; d'autre part, pour les durées de centrifugation de dix minutes et au delà, les valeurs sensiblement asymptotes de la réduction de  $C_t$  indiquent que l'on est proche de l'équilibre de sédimentation des plus petites particules visibles, et les chiffres obtenus sont affectés d'une erreur par défaut qui croît avec le temps. Nous avons considéré, et un calcul sommaire vérifie que, dans nos conditions d'expérience, les deux causes d'erreur en deçà et au delà, s'annulaient pratiquement, ce qui laisse sa valeur à la moyenne générale, mais tend à écarter les extrêmes.



Rappelons les chiffres trouvés par d'autres auteurs : Centrifugation : 180-170  $m\mu$  [Elford et Andrewes (10)] ; 240-103  $m\mu$  [Mc Intosh et Selbie (11)]. Filtration : 175-125  $m\mu$  [Elford et Andrewes (12)], 160-140  $m\mu$  [Levaditi, Païc et Krasnoff (13)].

*Conclusion* : Nos essais, pratiqués sans inoculation à l'animal, attribuent au virus vaccinal un diamètre particulière moyen de 179  $m\mu$ , avec des tailles extrêmes possibles de 223 et 127  $m\mu$ .

(Institut Pasteur.)

## ÉTUDE DU VIRUS DE LA LYMPHOGRANULOMATOSE INGUINALE (MALADIE DE NICOLAS ET FAVRE) AU MOYEN DE L'ULTRACENTRIFUGATION

par P. LÉPINE, J. GIUNTINI et JEAN C. LEVADITI.

Avec le même appareillage et la même technique que ceux décrits dans la note précédente (1), nous avons cherché à déterminer la taille du virus de la lymphogranulomatose inguinale.

Le problème est théoriquement le même que pour la vacciné, mais on se heurte à une difficulté pratique : elle tient à la nature même des corpuscules qui, moins encore que ceux de la vaccine, présentent, examinés au microscope à fluorescence, un aspect ou une luminescence qui les différencie des autres particules.

Des poumons hépatisés de souris infectée par voie respiratoire avec la souche Kam... servaient à préparer des corps élémentaires suivant une technique analogue à celle utilisée pour la vaccine, à l'exception de l'emploi de la trypsine, qui, d'après nos essais détruit le virus (2). Il en résulte des suspensions très virulentes, mais fortement polydispersées, où il est impossible, soit en lumière de Wood, soit avec la coloration de Morosow, de distinguer ce qui est le virus des autres particules provenant des tissus broyés.

(10) W. J. ELFORD et C. H. ANDREWES. *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 422.

(11) J. MC INTOSH et F. R. SELBIE. *Brit. J. exp. Path.*, 1937, **18**, 166.

(12) W. J. ELFORD et C. H. ANDREWES. *Brit. J. exp. Path.*, 1932, **13**, 36.

(13) C. LEVADITI, PAÏC et KRASNOFF. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 526.

(1) P. LÉPINE, J. LEVADITI et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1941, **67**, 477.

(2) Nous avons employé une trypsine commerciale et il n'est pas impossible que cette destruction du virus soit due à des impuretés.

Nos expériences ont porté sur 5 séries d'essais, dont les résultats ont été concordants. Voici par exemple une des séries.

Essai du 20 octobre :  $C_0$  de la suspension :  $1,1.10^9$  particules ; vitesse  $N = 34.600$  pour tous les essais ; résultats :

$t$ (minutes)	$C_t$	$\frac{1}{t} \log \frac{C_0}{C_t}$	$d$ THÉORIQUE (m $\mu$ )	VIRULENCE
3 . . . . .	$5,3.10^8$	0,40570	136,2	++
6 . . . . .	$3,3.10^8$	0,08705	123,6	+++
8 . . . . .	$2,3.10^8$	0,08496	122,1	0
8 . . . . .	$2,4.10^8$	0,08265	120,5	0
12 . . . . .	$2,1.10^8$	0,05993	(102,6)	0
15 . . . . .	$2,4.10^8$	0,04408	(87,9)	0
18 . . . . .	$2,4.10^8$	0,03673	(80,3)	0

Ces chiffres appellent plusieurs remarques.

1° Il semblerait à première vue que l'on recueille des particules de plus en plus petites selon les durées de centrifugation (fig. 1,

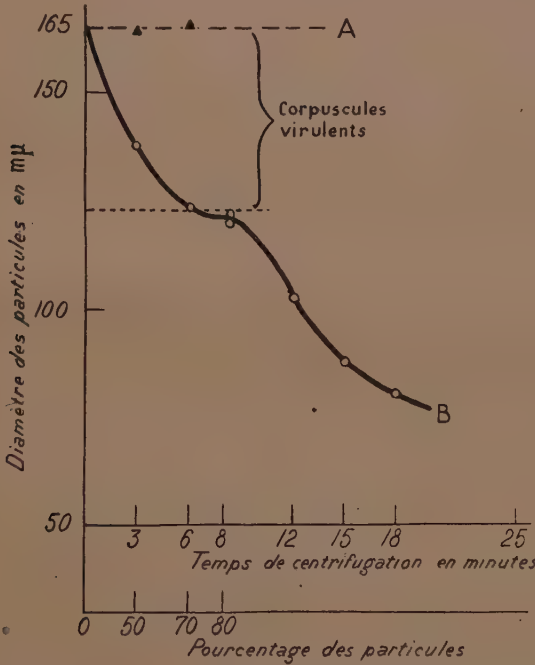


FIG. 1. — Courbe A, taille des corps élémentaires virulents. Courbe B, taille théorique et répartition statistique des diverses particules dans une suspension de virus lymphogranulomateux.

courbe A). Il n'en est rien. On voit par les chiffres de numération que, partie d'une concentration  $C_0$  de plus de 1 milliard de particules, la suspension s'abaisse en huit minutes à une concentration qui demeure constante et qui est en moyenne de 230 millions. Cette

concentration représente pour le champ centrifuge considéré, soit 13.300  $g$ , l'équilibre de sédimentation des particules visibles restantes, dont le diamètre réel ne s'abaisse pas au-dessous de 120  $m\mu$  (3).

2° Les inoculations du liquide centrifugé à l'animal (souris, voie intracérébrale) montrent, sans qu'il soit nécessaire de recourir à aucun titrage, que seuls les liquides centrifugés trois à six minutes sont virulents ; ceux de huit minutes, en équilibre de sédimentation, sont avirulents. Il en résulte que le virus lymphogranulomateux possède une taille qui, d'après l'ensemble de nos essais, est au minimum de 124  $m\mu$ .

3° A partir du moment où le liquide prélevé cesse d'être virulent (huit minutes), il faut considérer que les particules restantes sont composées d'éléments étrangers non virulents et que leur nombre, soit  $2,3 \cdot 10^8$ , est à retrancher des suspensions virulentes et de la suspension originelle, qui devient ainsi  $C_0 = 8,7 \cdot 10^8$ . Cette correction permet de calculer le diamètre des particules certainement virulentes, et celui-ci demeure sensiblement constant, quelle que soit la durée de centrifugation (fig. 1, courbe B) :

$t$ (minutes)	$C_t$	$\frac{1}{t} \log \frac{C_0}{C_t}$	$d$ RÉEL ( $m\mu$ )
3 . . . . .	$3 \cdot 10^8$	0,15413	164,5
6 . . . . .	$1 \cdot 10^8$	0,15658	165,8

4° La taille du virus lymphogranulomateux apparaît donc comme étant en majeure partie voisine de 165  $m\mu$ , avec un minimum possible de 124  $m\mu$ . Cette taille est en bon accord avec les résultats trouvés par l'ultrafiltration. Les expériences de Miyagawa et de ses collaborateurs (4) comme celles de Broom et Findlay (5) ont attribué en effet à ce virus une taille de 175 à 125  $m\mu$ . Levaditi, Paic et Krasnoff (6) lui donnent une taille de 140 à 100  $m\mu$ .

5° L'étude de la répartition statistique des particules numérables montre que nos suspensions de « corps élémentaires lymphogranulomateux » contiennent environ 70 p. 100 de particules ayant la taille des éléments certainement virulents.

(Institut Pasteur.)

(3) Cette valeur expérimentale est conforme aux données de l'optique. Le diamètre apparent que donne le calcul pour des durées de centrifugation supérieures à huit minutes tient uniquement à l'influence croissante de  $\frac{1}{t}$  sur une concentration devenue invariable. La formule ne s'applique donc plus.

(4) Y. MIYAGAWA, T. MITAMURA, H. YAOI, N. ISHII et J. OKANISHI. *Japan. J. exp. Med.*, 1935, **13**, 723.

(5) J. C. BROOM et G. M. FINDLAY. *Brit. J. exp. Path.*, 1936, **17**, 135.

(6) C. LEVADITI, PAIC et KRASNOFF. *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 1048.

PRÉSENTATION

**PRÉSENTATION DE PHOTOGRAPHIES D'ULTRAVIRUS  
AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE**

Au cours de la séance, M. C. Levaditi projette, en les commentant, une série de photographies originales d'ultravirus et de bactériophages obtenues au moyen du microscope électronique par MM. von Borries et E. et H. Ruska dans le laboratoire d'hypermicroscopie de M. von Ardenne.

---

PROCHAINES SÉANCES :

Jeudi 4 décembre 1941

Jeudi 8 janvier 1942

Jeudi 5 février 1942

Les séances ont lieu à 16 heures au Grand Amphithéâtre de l'Institut Pasteur.



# ASSOCIATION DES MICROBIOLOGISTES DE LANGUE FRANÇAISE

## TABLE ANALYTIQUE

<i>Amibes dysentériques</i> . Relation entre l'enkystement et la conservation du pouvoir pathogène des — en culture. . . . .	468
<i>Anaérobies</i> . Etude sur la longévité des bactéries — non sporulées. . . . .	471
— Recherches biochimiques comparées sur <i>Cl. bifermentans</i> , <i>Cl. sordellii</i> et <i>Cl. aerofœtidum</i> . . . . .	473
<i>Anavenins</i> . Les — spécifiques dans la production des sérums antivenimeux, respectivement dirigés contre les venins de <i>Cerastes cornutus</i> et de <i>Naja-Haje</i> . . . . .	355
<i>Anticorps</i> . Action du formol sur les —. Cas particulier du sérum antitétanique. . . . .	383
<i>Bactéries</i> . Le déterminisme de la virulence chez les —. . . . .	377
<i>Bacille pesteux</i> . Caractères essentiels des souches de — susceptibles d'être utilement employés comme vaccins vivants. . . . .	365
<i>Bacille tuberculeux</i> . Recherches sur la fréquence des différents types de — dans l'infection spontanée du chat. . . . .	467
<i>Gel silicique</i> . L'usage du — en microbiologie. . . . .	374
<i>Lèpre</i> . Altération du bacille de Hansen par les fixateurs ; rôle protecteur de l'acide phénique. . . . .	361
— Essais négatifs de la transmission de la — humaine au hamster de Syrie, <i>Cricetus auratus</i> . . . . .	360
<i>Levures</i> . Variabilité et sélection dans l'accoutumance des — à l'arsenic. . . . .	361
— Variabilité et accoutumance, causes d'indétermination dans l'étude des facteurs de croissance des —. . . . .	363
<i>Lymphogranulomatose inguinale</i> . Voir <i>Ultracentrifugation</i> .	
<i>Paludisme</i> . Epreuves négatives de transmission par l'Anophèle d'une souche ancienne de — d'inoculation. . . . .	462
<i>Rage</i> . Influence de l'anesthésie sur la transmission de la — par voie pulmonaire. . . . .	465
<i>Trypanosomes</i> . Infection du cobaye par le — des ruminants des Antilles, <i>Tr. vienneti</i> (souche américaine de <i>Tr. cazalboui</i> ). . . . .	359

# TABLE ANALYTIQUE

485

<i>Ultracentrifugation.</i> Dispositif simple d'— sans système d'observation. . . . .	380
— Détermination de la taille du virus vaccinal par l'— et le microscope à fluorescence. . . . .	477
— Etude du virus de la lymphogranulomatose inguinale (maladie de Nicolas et Favre) au moyen de l'—. . . . .	480
<i>Virus.</i> Conservation de quelques ultravirus par la dessiccation. . . . .	367
— Conservation des — par la congélation et par la dessiccation. . . . .	371
<i>Virus vaccinal.</i> Voir <i>Ultracentrifugation.</i>	

## TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

BAILLY (J.). — Voir REMLINGER (P.).	
BERAUD (P.). — Variabilité et sélection dans l'accoutumance des levures à l'arsenic. . . . .	361
— Variabilité et accoutumance, causes d'indétermination dans l'étude des facteurs de croissance des levures. . . . .	363
BOIVIN (A.). — Le déterminisme de la virulence chez les bactéries.	377
BOQUET (P.). — Voir RAMON (G.).	
CHABAUD (A.). — Altération du bacille de Hansen par les fixateurs ; rôle protecteur de l'acide phénique. . . . .	361
— Voir MARCHOUX (E.).	
CHORINE (V.). — Voir MARCHOUX (E.) et ROUBAUD (E.).	
CORDIER (P.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).	
DESCHIENS (R.). — Relation entre l'enkystement et la conservation du pouvoir pathogène des amibes dysentériques en culture.	468
GIRARD (G.). — Caractères essentiels des souches de bacilles pesteux susceptibles d'être utilement employés comme vaccins vivants. . . . .	365
GIUNTINI (J.). — Voir LÉPINE (P.).	
GORET (P.). — Voir VERGE (J.).	
GUIRAUD (P.). — Voir ROUBAUD (E.).	
LÉPINE (P.). — Dispositif simple d'ultracentrifugation sans système d'observation. . . . .	380
— GIUNTINI (J.) et LEVADITI (J.). — Etude du virus de la lymphogranulomatose inguinale (maladie de Nicolas et Favre) au moyen de l'ultracentrifugation. . . . .	480
— LEVADITI (J.) et GIUNTINI (J.). — Détermination de la taille du virus vaccinal par l'ultracentrifugation et le microscope à fluorescence. . . . .	477
LÉPINE (P.) et SAUTTER (V.). — Conservation des virus par la congélation et par la dessiccation. . . . .	371
LEVADITI (J.). — Voir LÉPINE (P.).	
MARCHOUX (E.), CHORINE (V.), CHABAUD (A.) et TISSEUIL (J.). — Essais négatifs de la transmission de la lèpre humaine au hamster de Syrie, <i>Cricetus auratus</i> . . . . .	360
NICOL (L.). — Voir RAMON (G.).	
PONS (R.). — Action du formol sur les anticorps. Cas particulier du sérum antitétanique. . . . .	383



PRÉVOT (A.-R.). — Etude sur la longévité des bactéries anaérobies non sporulées. . . . .	471
— et CORDIER (P.). — Recherches biochimiques comparées sur <i>Cl. bifermentans</i> , <i>Cl. sordellii</i> et <i>Cl. aerofætidum</i> . . . .	473
PROVOST (A.). — Voir ROUBAUD (E.).	
RAMON (G.), BOQUET (P.), RICHOU (R.) et NICOL (L.). — Les anavenins spécifiques dans la production des sérums antivenimeux, respectivement dirigés contre les venins de <i>Cerastes cornutus</i> et de <i>Naja-Haje</i> . . . . .	355
REMLINGER (P.) et BAILLY (J.). — Influence de l'anesthésie sur la transmission de la rage par voie pulmonaire. . . . .	465
RICHOU (R.). — Voir RAMON (G.).	
ROUBAUD (E.), CHORINE (V.) et GUIRAUD (P.). — Epreuves négatives de transmission par l'Anophèle d'une souche ancienne de paludisme d'inoculation. . . . .	462
— et PROVOST (A.). — Infection du cobaye par le trypanosome des ruminants des Antilles, <i>Tr. viennæi</i> (souche américaine de <i>Tr. cazalbouii</i> ). . . . .	359
SAUTTER (V.). — Voir LÉPINE (P.).	
SENTHILLE (F.). — Voir VERGE (J.).	
TISSEUIL (J.). — Voir MARCHOUX (E.).	
VERGE (J.) et GORET (P.). — Conservation de quelques ultravirus par la dessiccation. . . . .	367
— et SENTHILLE (F.). — Recherches sur la fréquence des différents types de bacilles tuberculeux dans l'infection spontanée du chat. . . . .	467
WINOGRADSKY (M <sup>me</sup> H.). — L'usage du gel silicique en microbiologie. . . .	374

---

Le Gérant : G. MASSON.



